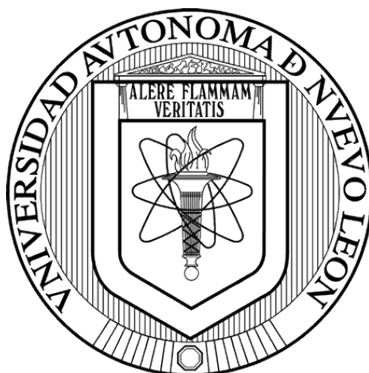


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**Laboratorio de Materiales Optoelectrónicos
Centro de Investigación de Biotecnología y Nanotecnología (CIBYN)**



**Aprovechamiento de residuos orgánicos para la obtención de compuestos
antioxidantes con aplicaciones biomédicas**

Por:

Biol. Adilson Guadalupe García González

**Como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias con
Orientación en Procesos Sustentables**

Enero, 2022

**Aprovechamiento de residuos orgánicos para la obtención de
compuestos antioxidantes con aplicaciones biomédicas**

Aprobación de tesis:

Dr. Carlos Enrique Escárcega González
Director de tesis

Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera
Evaluadora de tesis

Dr. David Paniagua Vega
Evaluador de tesis

Dr. Héctor Javier Amézquita García
Evaluador de tesis

RESUMEN

Adilson Guadalupe García González

Fecha: Enero, 2022

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título de tesis: Aprovechamiento de residuos orgánicos para la obtención de compuestos antioxidantes con aplicaciones biomédicas

Número de páginas: 64

Candidato para el grado de maestría en Ciencias con orientación de Procesos Sustentables

Área de estudio: Procesos Sustentables

Los residuos orgánicos son una problemática a nivel mundial, en muchos procesos industriales, generalmente son desechados sin un tratamiento previo, en conjunto con otros residuos urbanos crean contaminación y liberación de gases de efecto invernadero que contribuyen al cambio climático. Por lo tanto, el propósito de este trabajo fue la obtención de compuestos antioxidantes a partir de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*) y papa (*Solanum tuberosum*) y su mezcla, a través de una extracción convencional con solventes verdes como el agua y etanol, para posteriormente darles una aplicación biomédica a través de ensayos *in vitro*, para demostrar la presencia de los antioxidantes, su capacidad antioxidante y su actividad antiinflamatoria.

Se emplearon tres metodologías para la obtención de los compuestos antioxidantes, extracción con agua, extracción con etanol al 40%, extracción con etanol al 80% y se trabajaron en condiciones de 25 y 35° C.

Dentro de los resultados se obtuvo que la mayor extracción de compuestos fenólicos se encuentra en los extractos de naranja con valores de 51.22 ± 0.01 y 102.29 ± 0.08 mg GAE/g, donde los extractos de agua presentaron una mayor concentración de los mismos, para la actividad antioxidante 4 extractos mostraron una captación superior al 50% del radical DPPH, correspondiendo a los extractos de agua tanto para naranja como la mezcla. Tanto la biomasa, solvente y la temperatura presentan una influencia directa en la extracción de los compuestos antioxidantes, la biomasa en favor de las cáscaras de naranja y el solvente en relación al porcentaje de captación del radical DPPH.

Por medio de un estudio *in vitro* de línea celular PC-12, se determinó el porcentaje de viabilidad de las células (80% al 100%) en presencia de los extractos antioxidantes, donde se pudo comprobar que los extractos antioxidantes no presentan toxicidad y pueden tener una potencial aplicación biomédica.

La capacidad antiinflamatoria de los extractos se determinó a través de un estudio *in vitro* donde se sometió la albumina de suero bovino (BSA) a una temperatura de 60°C, en presencia de diferentes concentraciones de los extractos antioxidantes, donde se pudo comprobar el efecto positivo que estos tuvieron en evitar la desnaturalización de la proteína, en diversos porcentajes dependiendo de la dosis y el extracto empleado.

Contenido

CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1. Marco teórico	3
1.1.1. Residuos orgánicos como desperdicio y problemática mundial	3
1.1.2. Antioxidantes	6
1.1.3. Estrés oxidativo	9
1.1.4. Antioxidantes como protectores de órganos	11
1.1.5. Principales antioxidantes de naranja y papa.....	13
1.2. Antecedentes	14
1.2.1 Residuos orgánicos como problemática y su aprovechamiento.....	14
1.2.2. Residuos orgánicos como fuentes de valor agregado	16
1.2.3 Extracción de antioxidantes	17
1.2.4. Antioxidantes con aplicaciones <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	18
1.3. Aportación científica.....	21
1.4. Hipótesis.....	21
1.5. Objetivos	21
1.5.1. Objetivo general	21
1.5.1.1. Objetivos específicos	21
CAPÍTULO 2	22
METODOLOGÍA	22
2.1. Material y reactivos.....	22
2.2. Metodología general.....	24
2.3 Metodología específica	24
2.3.1. Extracción de antioxidantes	24
2.3.2. Filtración de los extractos	26
2.3.3. Eliminación del solvente por rotavapor	26
2.3.4. Liofilización de los extractos	27
2.3.5. Medición de compuestos fenólicos totales por Folin-Ciocalteu	27
2.3.6. Determinación de la capacidad antioxidante (DPPH).....	27
2.3.7. Cromatografía de capa fina (TLC).....	28
2.3.8. Evaluación de neurotoxicidad de los extractos antioxidantes en un modelo <i>in vitro</i>	28

2.3.9. Evaluación de la capacidad antiinflamatoria de los extractos antioxidantes en un modelo <i>in vitro</i>	29
2.3.9. Análisis estadísticos	29
CAPÍTULO 3	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
3.1. Extracción de los antioxidantes.....	30
3.2. Folin-Ciocalteu.....	32
3.3. Actividad antioxidante (DPPH)	40
3.4. Cromatografía de capa fina (TLC).....	46
3.5. Medición de la neurotoxicidad de los extractos.....	49
3.6. Evaluación de la capacidad antiinflamatoria de los extractos antioxidantes en un modelo <i>in vitro</i>	51
CONCLUSIONES	54
REFERENCIAS.....	55
ANEXOS	62

Índice de tablas

Tabla 1. Material	22
Tabla 2. Reactivos	23
Tabla 3. Equipos de laboratorio	23
Tabla 4. Resultados cuantitativos de CFT.....	34
Tabla 5. IC50, inhibición en mg/mL.....	45
Tabla 6. Factor de retención de muestras.....	49
Tabla 7. ANOVA del diseño factorial general para la obtención de CFT, presentes en los extractos de residuos orgánicos.....	62
Tabla 8. ANOVA del diseño factorial general para la actividad antioxidante DPPH de los extractos de residuos orgánicos.....	62

Índice de figuras

Figura 1. Estructuras moleculares de la quercetina y hesperidina.....	13
Figura 2. Estructuras moleculares del ácido clorogénico y ácido cafeico.....	14
Figura 3. Metodología general.....	24
Figura 4. TLC, compuestos fenólicos.....	48

Índice de gráficos

Gráfico 1. Resultados de los CFT.....	34
Gráfico 2. Efectos principales CFT en biomasa.....	37
Gráfico 3. Efectos principales CFT solvente.....	39
Gráfico 4. Efectos principales CFT temperatura.....	40
Gráfico 5. Porcentaje de captación de los extractos antioxidantes contra el radical DPPH.....	41
Gráfico 6. Efectos principales, porcentaje de captación, biomasa.....	42
Gráfico 7. Efectos principales. Porcentaje de captación, solvente.....	43
Gráfico 8. Efectos principales, porcentaje de captación, temperatura.....	44
Gráfico 9. IC50.....	45
Gráfico 10. IC50, extracto naranja en agua a 35°C.....	46
Gráfico 11. Porcentaje de viabilidad celular con concentraciones de los extractos.....	51
Gráfico 12. Porcentaje de inhibición de la desnaturalización de BSA.....	53

Nomenclatura

- ❖ ALP: Fosfatasa alcalina
- ❖ ALT: Alanina aminotransferasa
- ❖ ANOVA: Análisis de varianza
- ❖ AST: Aspartato aminotransferasa
- ❖ BSA: Albúmina de suero bovino
- ❖ CAT: Catalasa
- ❖ CCl₄: Tetracloruro de carbono
- ❖ CCl₃: Radical triclorometilo
- ❖ CF: Compuestos fenólicos
- ❖ CFT: Compuestos fenólicos totales
- ❖ CI₅₀: Concentración media inhibitoria
- ❖ CYP2E1: Citocromo P450 2E1
- ❖ CYP2B1: Citocromo P450 2B1
- ❖ CYP3A: Citocromo P450 3A4
- ❖ DPPH: 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl
- ❖ FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
- ❖ FC: Folin-Ciocalteu
- ❖ FRAP: Ferric Reducing/Antioxidant Power
- ❖ GSH: Glutación reducido
- ❖ GST: Glutación-S-transferasa
- ❖ HRE: Extracción por Reflujo de Calor
- ❖ LDH: Lactato deshidrogenasa

- ❖ MDA: Malondialdehído
- ❖ PBS: Buffer fosfato salino
- ❖ PEF: Campos Eléctricos Pulsados
- ❖ P-450: Citocromo P450
- ❖ Rf: Factor de retención
- ❖ RNS: Especies Reactivas de Nitrógeno
- ❖ ROS: Especies Reactivas de Oxígeno
- ❖ SOD: Superóxido Dismutasa
- ❖ TLC: Cromatografía de capa fina
- ❖ UAE: Extracción Asistida por Ultrasonido

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Los residuos orgánicos son una problemática a nivel mundial, debido a que muchos países no realizan una correcta disposición final o no los aprovechan de una manera sustentable. En México, Estados Unidos y Canadá se generan anualmente aproximadamente 265 millones de toneladas de residuos orgánicos y solo se aprovecha el 28.30% en actividades de compostaje o digestión anaeróbica, el resto tiene su disposición final en los rellenos sanitarios [1].

Debido a una tendencia hacia el crecimiento poblacional que se está generando a nivel mundial, esto va ligado a una mayor producción de alimentos, por lo tanto, un incremento en los desperdicios generados. Esto ha conducido a un mayor interés por el tratamiento y aprovechamiento de los residuos orgánicos [2],[3].

Los residuos orgánicos sólidos principalmente de frutas se componen de exocarpo como el flavedo y el albedo, endocarpo y mesocarpo, estos residuos se han utilizado para la alimentación animal, aprovechamiento de fibra como la pectina y producción de combustibles. Sin embargo, estos tipos de residuos han sido revalorados y se han obtenido productos de valor agregado. Las cáscaras de cítricos son una fuente importante de antioxidantes naturales y esto podría traer consigo aplicaciones en temas como la alimentación, nutrición y farmacológicas [4], [5].

Dados los diversos beneficios que se pueden obtener al aprovechar los residuos orgánicos y analizando sus aplicaciones y el posible impacto económico que pueden generar, actualmente se valoran diversos procesos para obtener componentes de valor agregado, a partir de los residuos de frutas y verduras como: la obtención de antioxidantes, ácidos grasos, proteínas, enzimas, entre otros. Esta es una gran alternativa para poder llevar a cabo nuevas metodologías en las áreas de biotecnología y biomedicina y de esta manera mejorar la economía en dicho rubro [6].

Al respecto, se han obtenido componentes de valor agregado a partir de las hojas de plantas, frutos, semillas, cascaras de frutas y verduras y han sido aprovechados como aplicaciones potenciales en el ámbito biomédico y ambiental, además, dichas obtenciones se han conseguido por medio de metodologías verdes [5].

Dentro de los biocomponentes importantes que se pueden obtener de los residuos de cascaras, se encuentran los compuestos polifenolicos de los cuales, las mejores propiedades que pueden poseer son; una efectiva capacidad antioxidante eliminando los radicales libres, los cuales son generados principalmente por especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS). Estos compuestos tienen una importancia en el ámbito biomédico ya que proporcionan medios efectivos para la prevención de enfermedades relacionadas con los radicales libres. Además, otros de los biocomponentes que se pueden obtener de estos residuos son los flavonoides que poseen las siguientes propiedades; una eficiente capacidad antioxidante, antiinflamatoria, reducen el estrés oxidativo, así como otros beneficios que han sido demostrados en diversos estudios [7].

En este proyecto, se busca la obtención de los compuestos antioxidantes presentes dentro de los residuos orgánicos, que serán cascarás de naranja y papa debido a que son

productos ampliamente consumidos en el estado de Nuevo León y se les busca dar un aprovechamiento sustentable. Todo esto realizado por medio de extracciones a través de metodologías sustentables no tóxicas a base de agua y etanol, para una posterior determinación de su capacidad antioxidante y aplicación biomédica.

1.1. Marco teórico

1.1.1. Residuos orgánicos como desperdicio y problemática mundial

Los residuos sólidos son un desafío para gran parte de los gobiernos a nivel mundial sobre todo en los países en desarrollo. Esto afecta en los costos y transporte de los mismos, debido a que cada vez se presenta una mayor generación de residuos, además la falta de comprensión en el manejo de los mismos [8].

Con un incremento de la población, se presentan factores como una urbanización acelerada y un incremento en la economía, reflejándose en los países en desarrollo, los cuales presentan un aumento en su calidad de vida, repercutiendo de manera directa en la tasa, calidad y cantidad de la generación de los residuos urbanos [8].

Dentro de los residuos sólidos se encuentran los denominados residuos orgánicos, que a nivel mundial presentan una generación aproximada de 1.3 billones de toneladas anuales. Estos residuos generalmente son desperdicios que se encuentran en las industrias, el sector agrícola, restaurantes y hogares. Dependiendo de la región estos residuos orgánicos pueden ser compostados, incinerados o convertirse en energías renovables, principalmente aprovechados para la obtención de biogás [2].

El desperdicio de residuos orgánicos causa problemas al generar gases de efecto invernadero que contribuyen al cambio climático. Hay diversos beneficios que se pueden obtener al lograr minimizar su impacto en el medio ambiente como lo son: el ecológico, ya

que ofrece las opciones de separarlos y designarles un sitio ya que estos podrían revalorarse; los beneficios económicos por la separación de los residuos se basa principalmente en el ahorro de tiempo y dinero; los beneficios sociales corresponden a que esta conciencia medio ambiental podría beneficiar a los negocios, debido a que pueden influir a que los clientes decidan comer en sitios donde se clasifica e incluso incentivándolos a realizar estas actividades dentro de los hogares [9], [10], [11].

En la industria alimentaria, la agricultura y en los restaurantes se producen en su mayoría residuos orgánicos provenientes de frutas y verduras, en años recientes han llamado la atención debido a que son aproximadamente el 60% de la producción total. Dentro de este proyecto se abordarán los residuos de las cáscaras de naranja y papa. Por lo tanto, se menciona que en la industria juguera se desperdicia aproximadamente el 50% de las frutas frescas convirtiéndose así en residuos orgánicos, la misma situación sucede con las cáscaras de papa, los productos que se obtienen como las papas fritas, el puré y los alimentos congelados, generan residuos de aproximadamente el 15% al 40% del peso fresco original, dependiendo del método de pelado [6], [12] .

Satari y Karimi en el 2018 [13], coinciden con lo anterior ya que mencionan que aproximadamente un tercio de las frutas cítricas utilizadas en la industria a nivel mundial, generan entre el 50 y 60% de residuos orgánicos. Dichos residuos poseen diversas características como un pH bajo (3-4), un alto contenido de materia orgánica que sería aproximadamente un 95% de sólidos totales y un alto contenido de agua entre el 80 al 90%. Esto es exclusivamente hablando de la industria citrícola, estos residuos son desechados y poco aprovechados en gran parte del mundo, por lo que buscar darles un aprovechamiento, para evitar así, generación de gases de efecto invernaderos, acumulación en rellenos

sanitarios, concientización para evitar que sean desechados en carreteras, ríos y zonas verdes, por lo tanto, esto está directamente relacionado con este proyecto ya que el poder aprovecharlos y darles una revalorización podría crear un punto de vista más amplio de que no son solo desechos orgánicos, si no que, estos residuos pueden traer beneficios en muchos aspectos y en diversas aéreas.

En cuanto a la papa se menciona que es uno de los cultivos más consumidos a nivel mundial después del maíz y el arroz. Se estima que más del 50% de la producción de la papa se consume después de su etapa de procesamiento en la industria. De manera general el procesamiento de la papa comienza con el pelado de los tubérculos, el cual se puede llevar a cabo por diversos métodos, pelado manual, por maquinaria o por abrasión siendo este el empleado principalmente en la producción de las papas fritas [12], [14].

De acuerdo a lo anterior, los residuos de naranja se pueden utilizar para la producción de enzimas, ácido cítrico, ácido succínico, oligosacáridos probióticos, producción de fibras dietéticas y antioxidantes naturales. Con los desperdicios de la papa se han mencionado que se obtiene ácido láctico debido al proceso de fermentación por el que pasan estos desperdicios en los sistemas sépticos, así como la obtención de compuestos fenólicos, cabe mencionar que los residuos de papa tienen una amplia generación dentro de los restaurantes siendo desperdicios de la cocina, por lo tanto, este tipo de residuos generados en dicha zona se consideran como los residuos más libres de contaminación, debido a su proceso de pelado [6], [9].

Para nuestro país con respecto a estos residuos se tiene que: México es el 5° productor de naranja a nivel mundial con 4,7 millones de toneladas anuales para 2020, de las cuales estas generan del 40 al 60% de residuos en cáscaras, mientras que el estado de Nuevo León

es el 4° productor de naranja a nivel nacional aportando con un 10.8% de la generación total [5],[15]. Para la papa México es el 35° productor a nivel mundial con 1.7 millones de toneladas anuales para 2020, generando aproximadamente 43,200 toneladas de residuos, mientras que el estado de Nuevo León es el 6° productor a nivel nacional aportando con aproximadamente el 10.4% de la generación total [15].

1.1.2. Antioxidantes

Un antioxidante se define como una sustancia capaz de eliminar las especies reactivas de oxígeno (incluso también especies reactivas de nitrógeno o especies reactivas de azufre), de manera directa o indirecta actuando como un regulador de defensa antioxidante o inhibidor de la producción de dichas especies reactivas [16], [17].

Los antioxidantes se pueden clasificar en diversas líneas de defensa dependiendo de sus mecanismos de acción; supresión de la formación de nuevos radicales, eliminación de los radicales libres, entre otros mecanismos [16].

La importancia que juegan en la salud de las personas es primordial debido a que muchas sustancias oxidativas pueden ingresar al cuerpo y de esta manera crean radicales libres que se acumulan y traen consigo complicaciones en la salud, por lo tanto, está demostrado que el consumo de antioxidantes ha traído consigo resultados benéficos contra diversas enfermedades [17].

Se ha reportado que el consumo bajo de antioxidantes y vitaminas incrementan la incidencia de enfermedades cardiovasculares y cáncer [16].

Dentro de las enfermedades que son desencadenadas por el estrés oxidativo se encuentran la arterosclerosis, diabetes, enfermedades cardiovasculares, inflamación, artritis

reumatoide, enfermedades neurológicas, lesiones en la piel y a un envejecimiento temprano. Por lo que es importante para el organismo el poder recibir antioxidantes exógenos para una mejor calidad de vida [18].

El origen de los antioxidantes es por medio de la síntesis de la glucólisis y del ácido shikímico, la formación es dada principalmente durante las fases de crecimiento de los vegetales y su contenido varía debido a factores tanto exógenos, endógenos, genéticos o ecológicos (bióticos o abióticos), por lo tanto, los antioxidantes como los polifenoles tienen en común su síntesis con los aminoácidos fenilalanina y tirosina y los carbohidratos que sufren reacciones de metilación, hidroxilación o glicosilación [19].

Los antioxidantes más populares incluyen diversas formas las cuales pueden ser como vitaminas, las cuales son vitamina A, C, E, también el beta caroteno, minerales, polifenoles naturales, cada uno de estos antioxidantes tienen un efecto en las células de nuestro cuerpo, que contribuyen a mejorar la salud en general [16].

La mayoría de las plantas y frutos poseen antioxidantes, que ayudan a su protección contra patógenos [12], [14]. Pero también estos compuestos tienen un rol en las respuestas de las plantas ante diferentes tipos de estrés, como el estrés térmico, el biótico, las lesiones y su tolerancia ante la exposición a los rayos UV y el ozono [20], [21]. En el caso del presente estudio estos compuestos se encuentran en las cáscaras tanto de naranja como de papa. Estos antioxidantes son conocidos como polifenoles, compuestos fenólicos, ácidos fenólicos y flavonoides, debido a que son moléculas que tienen propiedades antioxidantes y son una fuente importante en la dieta humana [18].

Estos compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas que son encontrados de manera natural en cualquier parte de las plantas y como previamente se

mencionó también presentes en los frutos. Algunos en mayor concentración dentro de las cáscaras, estos representan el grupo más importante de antioxidantes naturales, una fuente valiosa de antioxidantes exógenos [18], [22].

El reactivo Folin-Ciocalteu es un reactivo cuya finalidad es la determinación de compuestos fenólicos en los extractos. Este reactivo se forma por dos ácidos, fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), los compuestos fenólicos al entrar en contacto con el reactivo provocan una oxidación de estos ácidos, dando lugar a que se reducen en óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), respectivamente. El mecanismo de esta reacción es a través de la transferencia de electrones, esto es debido a un ion fenolato, el cual se forma por la disociación del protón fenólico, con lo cual se reduce el reactivo de FC, todo esto trabajando bajo condiciones alcalinas, estas condiciones se logran con ayuda del carbonato de sodio a un pH >10. Para la determinación de fenoles totales, se tiene a los compuestos resultantes de color azul, los cuales poseen una absorbancia de 760 nm, esta absorbancia determina de manera proporcional la cantidad de compuestos fenólicos totales dentro de la muestra [23], [24].

Los ensayos *in vitro* son ampliamente utilizados para determinar la capacidad antioxidante, estos tienen su base principal en la captación de los radicales libre u óxidos de los antioxidantes. Los métodos actualmente que más se utilizan son: 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH); 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) o ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS); Ferric ion Reducing Antioxidant Power o Capacidad antioxidante para Reducir el ion Férrico (FRAP); Oxygen Radical Absorbance Capacity o Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC); Total radical trapping power o poder de captación de radicales totales (TRAP); Trolox Equivalent

Antioxidant Capacity o capacidad antioxidante de equivalentes al Trolox (TEAC). Estos ensayos ofrecen una gran ventaja al ser rápidos y simples, pero también cuenta con desventajas ya que los resultados pueden deberse a diversos factores externos e internos como las interacciones de los antioxidantes, los materiales con los que se trabajan, el tiempo de la reacción, pH, entre otros [25].

Para la presente investigación se trabajó con el método DPPH que se basa en la capacidad del radical libre DPPH, el cual es un radical libre estable que cuenta con un electrón desapareado debido a la deslocalización del mismo y le permite el aceptar un átomo de hidrógeno (H^+). La solución de DPPH presenta una coloración violeta, pero al reaccionar con una antioxidante donador de un átomo de hidrógeno, el color violeta presenta un desvanecimiento tornándose de color amarillo. Este cambio de color se puede monitorear espectrofotométricamente a una absorbancia entre 515 a 517 nm, con esto se puede determinar la capacidad antioxidante del sustrato o extracto. Los resultados se pueden expresar como la concentración media inhibitoria (CI_{50}), dicho valor está relacionado con la cantidad antioxidante que se necesita para poder disminuir el DPPH en su concentración inicial al 50%. Para calcular este valor se grafica el porcentaje de inhibición contra la concentración del extracto empleado [26], [27].

1.1.3. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como la producción desequilibrada de radicales libres y las defensas antioxidantes (balance redox) encargadas de la estabilización de dichos radicales, ya que cuando estos presentan una mayor concentración causan daños a nivel celular, como la peroxidación de lípidos, daño oxidativo al DNA y a las proteínas [28], [17].

Las ROS son las principales causantes de radicales libres y por ende las causantes del estrés oxidativo. Los organismos aeróbicos necesitan del oxígeno, este elemento es vital, ya que, es la fuente principal de energía de la célula y actúa como un oxidante terminal en la cadena respiratoria mitocondrial [29].

Estas especies reactivas de oxígeno son: radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical peroxilo (ROO^{\cdot}), radical alcoxi (RO^{\cdot}), radical hidroxilo (HO^{\cdot}) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estas moléculas para su estabilización pueden reaccionar con otras moléculas como el óxido nítrico (NO^{\cdot}) y de esta manera formar RNS. Estos radicales libres son moléculas que presentan electrones desapareados pueden ser uno o más, presentándose como cationes radicales o aniones radicales. Estos radicales causan daños celular porque son moléculas inestables y reactivas, que pueden reaccionar con los electrones de las moléculas más cercanas [28], [29].

Tanto las especies de ROS y RNS se encuentran en equilibrio dentro de las células de los organismos aeróbicos, ya que aquí es donde se producen, sin embargo, estas se encuentran en homeostasis junto con las moléculas antioxidantes y enzimas [16]. Las especies ROS que se derivan de la cadena respiratoria, poseen funciones fisiológicas cuando se encuentran en concentraciones bajas o moderadas, dentro de sus funciones se encuentra el actuar como defensa ante infecciones y mantener el equilibrio redox [17].

De acuerdo a lo anterior tenemos que las especies reactivas se pueden generar en el metabolismo o adquirirse de manera externa por ejemplo: por medio de la contaminación, fumar, organismos unicelulares, alérgenos, pesticidas, la luz gama o la luz ultravioleta, todos estos factores causan la formación de los radicales libres los cuales pueden provocar diversas enfermedades [16].

Las diversas enfermedades y complicaciones a causa de un nivel alto de radicales libres en el organismo pueden desencadenar en: desintegración de la membrana celular, daño en el DNA causando una mutación, daño en las proteínas de membrana, desencadenando todo esto en enfermedades como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, diabetes, ayuda a un envejecimiento más rápido y disfunciones cardiovasculares, artritis reumatoide, lesiones en la piel, inflamación, aterosclerosis [30], [31], [16], [18].

1.1.4. Antioxidantes como protectores de órganos

El hígado es el primer órgano en ser afectado por alguna molécula dañina que pueda entrar en el sistema circulatorio, por lo tanto, es propenso a sufrir la mayoría de los daños causados por las ROS, cuando estos daños se presentan se ha comprobado y observado que disminuyen las defensas antioxidantes del hígado las cuales son Superóxido Dismutasa (SOD) y Catalasa (CAT) [32], [28].

En el hígado se encuentran presentes diversos tipos de células las cuales son: hepatocitos, células Kupffer, células endoteliales sinusoidales del hígado y células estrelladas hepáticas. En el hígado el estrés oxidativo juega un rol importante ya que este puede provocar una fibrosis y posteriormente una cirrosis [28].

Las moléculas que pueden causar daño al organismo son conocidas como ROS, estas se pueden formar por procesos celulares naturales o normales de forma endógena y por factores ambientales siendo esta una formación exógena. Los ROS incluyen diversas especies no radicales como lo son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$), oxígeno singlete (1O) y radicales libres como el radical anión superóxido (O_2^-), hidroxilo (OH^*) e hidropéroxido ($ROOH$). Cuando estas especies reactivas se encuentran en altas concentraciones provocan un desbalance oxidativo-antioxidante y estrés oxidativo, cabe

mencionar que las especies reactivas son importantes para diversos mecanismos moleculares, que participan en funciones celulares importantes, siempre y cuando se encuentren en concentraciones fisiológicas, sin embargo, cuando estas concentraciones son más altas provocan los problemas discutidos [18].

Cuando hay una fuerte condición de estrés oxidativo, las capacidades de defensa del hígado contra las ROS se ven insuficientes, ya que estas especies afectan los mecanismos de defensa antioxidante alterando la actividad antioxidante de SOD y CAT. Esto sugiere un incremento de radicales libres que causan daño. Dicho esto, se ha mencionado que la administración de antioxidantes exógenos provenientes de vegetales, han mostrado un efecto hepatoprotector frente al daño oxidativo y hepatotoxicidad. Permitiendo que se normalicen las enzimas antioxidantes y previniendo el daño en el hígado. Esto ha sido probado con el incremento de SOD, CAT y GST y la disminución de los radicales MDA en tejido [32], [33].

Dentro de los modelos *in vitro* y modelos *in vivo* se utiliza el CCl_4 para inducir la toxicidad en hígado. Un mecanismo básico de como este agente actúa es mediante diversos citocromos de isoformas P-450: CYP2E1, CYP2B1 y posiblemente CYP3A, para formar el radical tricolorometilo (CCl_3) el cual inicia la reacción de peroxidación de lípidos. Por lo que el CCl_3 y sus derivados reaccionan con los ácidos grasos insaturados en las membranas celulares, causando una disrupción en los procesos celulares y dejando a la célula sin protección. Dentro de los estudios *in vitro* se ha observado niveles reducidos de GSH, mayor actividad de LDH y producción de MDA [34].

Es importante señalar que los antioxidantes se tienen que consumir de manera responsable y moderada, esto es algo conocido en la comunidad médica, pero no por la población en general, la cual emplea el uso de antioxidantes en dosis mucho mayores que las

que se encuentran dentro de los alimentos naturales, lo cual puede desencadenar en efectos adversos, debido a la creencia de que un producto natural no puede ser tóxico [16].

1.1.5. Principales antioxidantes de naranja y papa

Existe una gama alta de antioxidantes presentes en las cáscaras de naranja que se han reportado en diversos estudios a concentraciones distintas dependiendo de los métodos de extracción. Los principales compuestos antioxidantes reportados para la cáscara de naranja son ácido gálico, ácido p-cumárico, ácido trans-ferúlico, narginina, hesperidina, quercetina, rutina, miricentina, resveratrol [35].

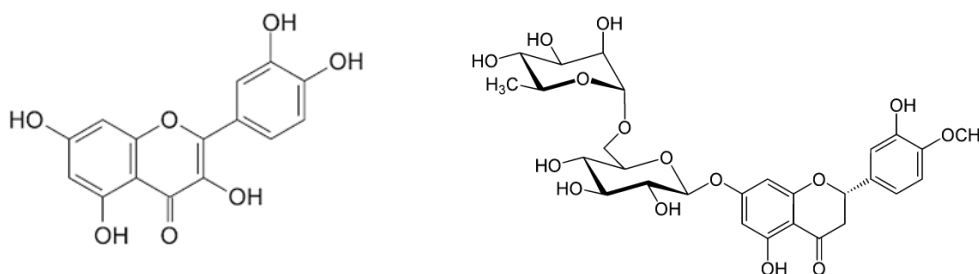


Figura 1. Estructuras moleculares de la quercetina y hesperidina.

Los polifenoles que se encuentran en mayor concentración dentro de las cáscaras de naranja según la literatura corresponden a rutina, hesperidina y ácido trans ferúlico[36].

Los cítricos son fuentes importantes de fitoquímicos como las vitaminas A, C y E, minerales, flavonoides, cumarinas, limonoides, pectinas, entre otros componentes. Pero los polifenoles son los componentes con una amplia variedad de compuestos bioactivos que pueden ser de diversas clases como: ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, antocianinas, proantocianidinas, flavonoides, estilbenos y lignanos. En los cítricos se ha asociado positivamente la capacidad antioxidante con el contenido total de polifenoles, por lo que se infiere que son el componente antioxidante dominante [25].

Las cáscaras de papa presentan compuestos antioxidantes, sin embargo, su concentración varía dependiendo del método de extracción. Los compuestos mayormente reportados son los ácidos fenólicos que son los siguientes: el ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido p-cumárico y el ácido ferúlico, también se ha reportado el ácido protocatéquico, ácido vanillico, ácido siríngico, ácido sinápico, ácido gálico. Los flavonoles como: la catequina, rutina y kaempferol y las antocianinas [20].

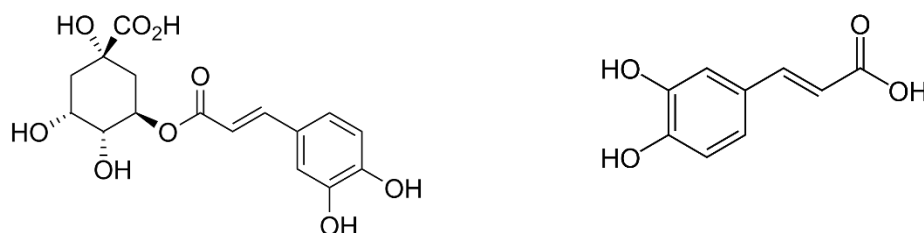


Figura 2. Estructuras moleculares del ácido clorogénico y ácido cafeico.

En papa el principal polifenol encontrado corresponde al ácido cafeico, pero esto podría deberse a diversos factores ya que el compuesto más abundante en estas cáscaras es el ácido clorogénico, sin embargo, si las cáscaras son almacenadas a temperatura ambiente o en la presencia de luz, el ácido clorogénico se transforma en ácido cafeico o ácido quínico. Esto es muy común debido a que las industrias almacenan las papas a temperatura ambiente y en ocasiones en presencia de luz solar [14].

1.2. Antecedentes

1.2.1 Residuos orgánicos como problemática y su aprovechamiento

Una gran cantidad de residuos orgánicos se han desperdiciado a nivel mundial, desde los desperdicios alimenticios en comercios, la biomasa verde, madera, entre otros [37].

Debido al aumento poblacional y la alta demanda de alimentos a nivel mundial, se han generado gastos económicos al utilizar recursos como: agua, energía eléctrica y fertilizantes que se han utilizado en las zonas agrícolas para la producción de vegetales [2].

En otro estudio realizado por Pleissner y colaboradores en el 2016 [6], mencionan que la cantidad estimada de residuos agrícolas están entre 3.7×10^9 toneladas al año, generados principalmente por la industria agrícola a nivel mundial.

Dentro de la problemática que se genera por los residuos orgánicos (cáscaras de frutas y verduras) se encuentra la económica, debido a los gastos que se generan y en el aspecto ambiental por los procesos de fermentación y la descomposición bacteriana [38]. Por lo tanto, la importancia del aprovechamiento de residuos orgánicos como fuentes de valor agregado puede traer consigo un mejoramiento económico, lo cual, puede llevarse a cabo por medio de procesos biotecnológicos para diversas áreas como la farmacéutica, biomédica para la producción de compuestos de valor agregado como podrían ser fármacos a través de los residuos generados y con esto se contribuiría al desarrollo de la economía basada en procesos biológicos y químicos[6].

Dentro de los aprovechamientos que se le pueden dar a los residuos orgánicos se encuentra el poder emplearlos como composta aplicada en campos agrícolas, lo que ha dado como resultados una reducción de fertilizantes sintéticos; además, se emplea el uso de la digestión anaeróbica, con el fin de la obtención de biogás (metano) siendo una de las alternativas para la producción de energía eléctrica; a partir de estos residuos orgánicos también se ha obtenido biohidrógeno [8], [39] y bioetanol [40].

1.2.2. Residuos orgánicos como fuentes de valor agregado

En un estudio publicado por Fritsch Caroline y colaboradores [41], mencionan la preocupación del creciente desperdicio de los residuos orgánicos a nivel mundial, por lo tanto, diversos estudios mencionan el aprovechamiento de residuos orgánicos como residuos de papa, tomate, aceite de oliva y cereales. Donde se han obtenido compuestos fenólicos, aceites esenciales, alcaloides, proteínas, vitaminas, carotenoides, entre otros[41].

Dentro del mismo estudio, se menciona que la papa entera posee pocas cantidades de polifenoles. Sin embargo, sus cascaras están enriquecidas de polifenoles, por lo tanto, la importancia de su aprovechamiento [41].

El uso de la papa dentro de la industria cobra relevancia debido a que es ampliamente consumida a nivel mundial, sin embargo, la cáscara es desechada en la mayoría de las industrias, siendo alrededor del 40% de residuos. Taher y colaboradores en el 2017 [40], mencionan que existen diversos estudios que demuestran la obtención de antioxidantes y moléculas antimicrobianas a partir de la cascara de papa como residuo [42].

En el mismo año según datos de la FAO (por sus siglas en inglés: Food and Agriculture Organization), 2017 [43], como previamente se había mencionado, México se encuentra dentro de los países con mayor producción de cítricos a nivel mundial, aproximadamente 6.624 millones de toneladas para el 2016; de igual manera, considerando estas cifras y con una exportación de solo el 10.47%, es importante el tratado y disposición correcta de estos residuos orgánicos generados.

Los cítricos a nivel mundial son ampliamente cultivados y consumidos. Uno de los atributos más importantes que poseen es que presentan altos valores nutricionales y además sus diversos compuestos se han empleado en aplicaciones biomédicas. Entre el 50 y 60 % de

los residuos de los cítricos son generados a partir de su producción en la industria; dentro de las principales características que poseen son; un pH ácido, una gran cantidad de materia orgánica y contenidos altos de agua[13]. Sin embargo, estos valores se pueden ver alterados a causa de las condiciones ambientales y el tiempo transcurrido desde su desecho.

1.2.3 Extracción de antioxidantes

A lo largo del tiempo, se han empleado diversos métodos para la extracción de compuestos de valor agregado. Bozinou y colaboradores en 2019 [44], emplearon diversos métodos de extracción para la determinación de la capacidad antioxidante de la especie *Moringa oleífera*. Las técnicas empleadas en este estudio fueron Campos Eléctricos Pulsados (PEF), microondas (350 W), ultrasonido, agua hirviendo, agua a temperatura ambiente (control); estas técnicas se han empleado para la obtención de compuestos fenólicos, componentes aromáticos y colorantes. Se realizaron 8 pruebas para PEF, donde se presentaron variaciones en los tiempos e intervalos de pulsación y una prueba para las demás técnicas con sus condiciones establecidas. Los resultados mostraron que la extracción con mayor cantidad de polifenoles fue para el método de PEF 5. Dichos resultados son proporcionales a la actividad antioxidante por DPPH y FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power).

En un estudio realizado por Mejía-Gómez y colaboradores en el 2019 [35], donde se realizó la extracción y cuantificación de polifenoles bioactivos con tres especies de cítricos: *Citrus sinensis* L. Osbeck (naranja dulce), *Citrus lemon* L.(limón) y *Citrus×clementina* (clementina). La extracción de los polifenoles la realizaron a partir de las cáscaras secas de dichos cítricos. Los resultados mostraron que la temperatura tiene una alta influencia en el procedimiento de extracción. Sin embargo, observaron que esto dependía de los polifenoles

de interés. Con el empleo de este método demostraron que se puede obtener una extracción efectiva a base de etanol y agua con un incremento de temperatura.

En el mismo año Kexin Hao y colaboradores [45], realizaron un estudio para la extracción total de fenoles en la especie *Citrus aurantium* L. blossoms (CAB) obtuvieron como resultado que el rendimiento total de los fenoles fue de 95.84 mg GAE/g DM (equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco), el cuál era muy cercano al valor teórico 96.12 mg GAE/g DM. En el estudio se empleó el método de extracción asistida por ultrasonido (UAE por sus siglas en inglés) y el método extracción por reflujo de calor (HRE por sus siglas en inglés), al comparar estos métodos se determinó que el método UAE probó una alta eficiencia. Los resultados obtenidos por este método mostraron que el extracto fenólico total tuvo excelentes propiedades para la eliminación de radicales libres DPPH, ABTS+, radical hidroxilo (OH) y radical anion superoxido (O₂).

1.2.4. Antioxidantes con aplicaciones *in vitro* e *in vivo*

Syed y colaboradores en el 2014 [46], realizaron un estudio *in vitro* para determinar el efecto hepatoprotector de la especie *Raphanus sativus* (rábano o rabanillo) en contra del tetracloruro de carbono (CCl₄) el cual induce un daño hepático y es uno de los modelos más ampliamente usados para el daño hepático, el cual dentro del organismo es metabolizado por el citocromo P-450. Los extractos empleados en este estudio fueron etanólicos y metanólicos. Dentro de los resultados que se obtuvieron pudieron determinar que una dosis de 300 mg/kg en ambos extractos mostraron una parcial protección en hígado que fue inducido con un daño del CCl₄, se demostró que con la administración de los compuestos antioxidantes se presentó un incremento en los niveles de Catalasa y GSH, que son enzimas encargadas de la eliminación de los radicales libres.

Pan y colaboradores en el 2018 [47], realizaron un estudio muy similar para determinar el efecto preventivo de los polifenoles del té *lui bao*, contra el tetracloruro de carbono (CCl₄). Los resultados en el suero de los modelos murinos demostraron que hubo una regulación en los niveles metabólicos, así como, de la regulación de los niveles de citocinas, todo esto es debido a que los componentes poseen un amplio rango de actividades biológicas, con lo que se demostró que los polifenoles tienen un efecto preventivo ante el daño de CCl₄ inducido en el hígado. Los antioxidantes han mostrado una eficiencia como hepatoprotectores al exponerse en conjunción con agentes que inducen el daño hepático en modelos murinos, mostrando resultados positivos en muestras de tejido y suero [32].

En diversos estudios *in vitro* se ha observado que el empleo de extractos ricos en compuestos antioxidantes o fenólicos provenientes de diversas frutas o plantas, como el limón, plantas exóticas como *Campomanesia adamantium*, *Morinda pubescens*, aplicados tanto a líneas celulares hepáticas humanas como a líneas celulares de ratones a las cuales se les ha inducido un daño por medio del CCl₄, ha presentado que en presencia de estos extractos han podido restablecer los niveles en suero de alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y fosfatasa alcalina (ALP) [48], [49], [50], [51].

Ling-Si y colaboradores [52] en un estudio *in vitro* determinaron la citotoxicidad y el efecto neuroprotector del isocampneoside II (ICD), un antioxidante extraído de la especie *Paulownia tomentosa*, en un cultivo de células PC12. Las células fueron expuestas durante 6 horas con el ICD, donde se mostró que no hubo un efecto inhibitorio en el crecimiento celular, mientras que para su efecto neuroprotector se presentaron resultado de protección en las células con las concentraciones de 6.25, 12.5, 25 y 50 µL contra el daño provocado por el

H₂O₂, permitiendo la supervivencia celular en $58.7 \pm 0.9\%$, $78.8 \pm 1.1\%$, $89.4 \pm 3.3\%$, y $92.0 \pm 6.4\%$, respectivamente.

En un estudio similar realizado por Xiong y colaboradores [53], determinaron la el efecto neuroprotector en células PC12, con extractos de la especie *Morchella importuna*, en contra de H₂O₂, con concentraciones superiores a 100 a 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$, de esta manera dichos extractos antioxidantes causan una inhibición de la apoptosis en las células PC12 que es inducido por el H₂O₂. Actuando de manera en la que se incrementa la captación de radicales, disminuyendo la generación de MDA y permitiendo las actividades de las enzimas SOD y CAT.

En otro estudio realizado por Sleem y colaboradores [54], donde se probó el efecto antiinflamatorio de extractos de la especie *Moringa oleífera*, los extractos se realizaron a través de un ensayo *in vitro*, para probar su efecto antiinflamatorio, en la protección de la desnaturalización de la proteína de albúmina de suero bovino (BSA), dentro de los resultados obtenidos se determinó que los extractos de metanol exhibieron el máximo porcentaje de inhibición de desnaturalización del BSA, comparable con el diclofenaco de sodio y mayor que el piroxicam en todas sus concentraciones.

1.3. Aportación científica

Esta investigación aportará una extracción de antioxidantes con potenciales aplicaciones biomédicas a base de residuos orgánicos por metodologías verdes mediante el uso de solventes no tóxicos como agua y etanol.

1.4. Hipótesis

Mediante procesos sustentables a partir de residuos orgánicos como cáscaras de naranja y papa, se obtienen compuestos con actividad antioxidante aplicables en el área biomédica.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

Realizar la extracción de antioxidantes por medio de solventes verdes, a partir de residuos orgánicos para su posterior aplicación biomédica.

1.5.1.1. Objetivos específicos

- Extraer antioxidantes a partir de la cascara de papa y naranja utilizando solventes no tóxicos como agua y etanol.
- Determinar a cantidad de compuestos fenólicos totales por medio del reactivo Folin-Ciocalteu.
- Determinar la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de los residuos orgánicos mencionados, mediante el método del radical DPPH.
- Determinar la capacidad de los extractos antioxidantes como posible agente antiinflamatorio en un modelo *in vitro*.

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA

2.1. Material y reactivos

A continuación, se presenta el material, reactivos y equipo de laboratorio que se emplearon para el desarrollo del proyecto:

Tabla 1. Material

Material orgánico	
Cascaras de naranja (<i>Citrus sinensis</i>)	Cáscaras de papa (<i>Solanum tuberosum</i>)
Material	Marca
Tubos de centrifuga 50 mL	Corning
Vasos de precipitado 250 mL	Kimax
Probetas graduadas de 50 y 100 mL	Kimax
Embudo Buncher de vidrio	-
Papel filtro #1 11cm	Whatman
Matraz Kitasato 500 mL	Kimax
Micropipetas de 50, 200 y 1000 μ L	Eppendorf
Tubos de ensayo 18X150 MM	Kimax
Placa de poliestireno de 96 pozos, esteril	Falcon
Frasco de vidrio con tapa	-

Tabla 2. Reactivos

Reactivos	Marca
Agua destilada	-
Alcohol etílico (etanol)	-
Reactivo Folin-Ciocalteu	Sigma Aldrich
Carbonato de sodio (Na ₂ CO ₃)	-
2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH)	Sigma Aldrich
Ácido gálico	Sigma Aldrich
Línea celular neuronal PC-12	-
Tripsina	-
EDTA	-
Medio RPMI-1640	-
Tritón 1%	-
Solución MTT	-
Alcohol isopropílico	-
Ácido clorhídrico (HCl)	-

Tabla 3. Equipos de laboratorio

Equipos de laboratorio	Marca
Balanza analítica	Sarforius
Refrigerador de 4°C	Whirlpool Modelo WT1818A
Congelador -20°C	Torrex CHTC-145
Centrífuga	Centuruion scientific limited Modelo K241
Espectrofotómetro UV-Vis	Jenway 7315
Bomba de vacío	Rocker 400
Rotavapor	R-100
Liofilizadora	Labconco
Incubadora	-

2.2. Metodología general

En la siguiente figura se presenta la metodología general del proyecto, en base a todas las actividades correspondientes para su desarrollo hasta el análisis de los resultados.

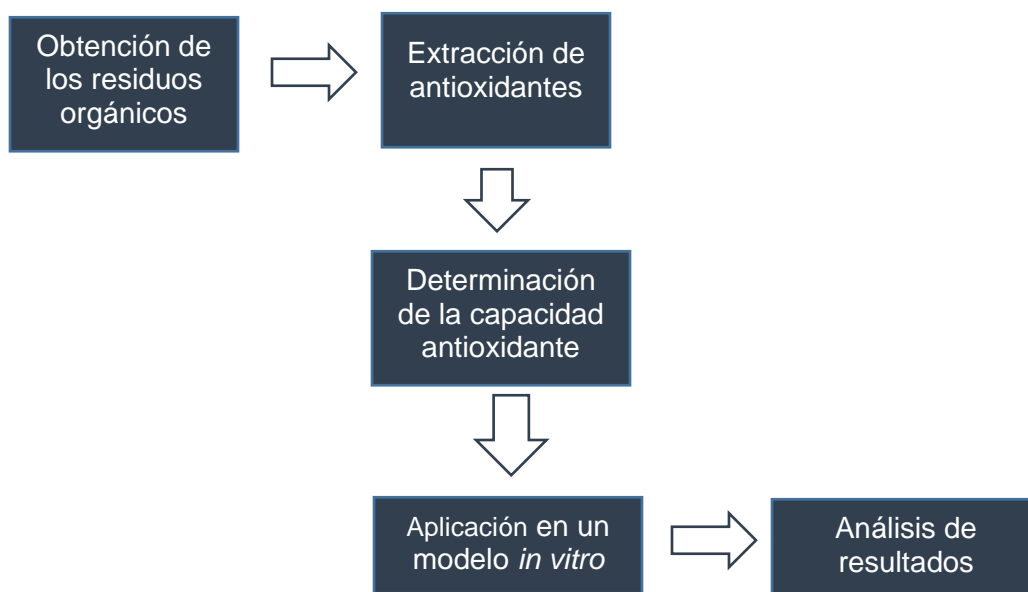


Figura 3. Metodología general

2.3 Metodología específica

En esta sección se describe de manera detallada todas las técnicas y procedimientos que se realizaron para llevar a cabo el desarrollo de este trabajo de investigación, siguiendo los pasos experimentales que conforman cada objetivo en particular.

2.3.1. Extracción de antioxidantes

Las siguientes metodologías fueron realizadas para la extracción de los antioxidantes de las cascaras de naranja y papa, que se describirán a continuación:

Se pesaron 10 gramos de cáscara de naranja o papa y su mezcla de 5 gramos de cáscara de naranja y 5 gramos de cáscara de papa, posteriormente se depositaron en un vaso de precipitado de 250 mL que contenía 100 mL de agua destilada. Las condiciones en las que se llevó a cabo el proceso fueron en un tiempo de 30 minutos a temperatura ambiente (25°C) y con temperatura de 35°C, en estado de agitación a 200 rpm sobre una parrilla eléctrica. Posteriormente se centrifugó el extracto a 9500 rpm por 10 minutos.

La segunda extracción realizada fue basada en las publicaciones de Mejía-Gómez en 2019 y Zhang y colaboradores en 2018 [35], [31], con algunas modificaciones, consistió en pesar 10 gramos de la cáscara de naranja o papa y su mezcla de 5 gramos de cáscara de naranja y 5 gramos de cáscara de papa, posteriormente se depositaron en un vaso de precipitado de 250 mL, que contenía 100 mL de una mezcla de 40 mL de etanol y 60 mL de agua destilada, para obtener una concentración de etanol al 40%. Las condiciones en las que se llevó a cabo el proceso fueron en un tiempo de 30 minutos a 25° y 35°C en estado de agitación a 200 rpm sobre una parrilla eléctrica. Posteriormente se centrifugó el extracto a 9500 rpm por 10 minutos.

La tercera extracción también basada en las publicaciones de Mejía-Gómez y colaboradores en 2019 y Zhang y colaboradores en 2018 [35], [31], con algunas modificaciones, consistió en pesar 5 gramos de cáscara de naranja y 5 gramos de cáscara de papa, posteriormente se depositaron en un vaso de precipitado de 250 mL que contenía 100 mL de una mezcla de 80 mL de etanol y 20 mL de agua destilada, para obtener una concentración de etanol al 80%. Las condiciones en las que se llevó a cabo el proceso fueron en un tiempo de 30 minutos a 25° y 35° C en estado de agitación a 200 rpm sobre una parrilla eléctrica. Posteriormente se centrifugó el extracto a 9500 rpm por 10 minutos.

2.3.2. Filtración de los extractos

Una vez centrifugados los extractos se procedió a realizar la filtración de los mismos para la eliminación de moléculas de mayor tamaño y restos de los residuos orgánicos. Se utilizó un papel filtro Whatman #1, recortándose en círculos de aproximadamente 2 cm de diámetro, para colocar dentro de un vaso de crisol, posteriormente el vaso se colocó sobre un embudo, el cual se colocó sobre un matraz Kitasato, este matraz se conectó por medio de una manguera a una bomba de vacío, una vez que se hace esto se procede a colocar el extracto sobre el vaso de crisol y se encendió la bomba de vacío, la cual permite pasar el extracto de una manera más rápida y eficiente, una vez filtrados los extractos estos se colocaron en tubos Corning de 15 mL y se almacenaron en refrigeración a 4°C hasta el paso siguiente.

2.3.3. Eliminación del solvente por rotavapor

Una vez filtrados los extractos se procederá a la eliminación del solvente etanol, este paso se realiza debido a que la liofilizadora no trabaja con muestras hidroalcohólicas como las de este proyecto. Por lo tanto, se utilizará el rotavapor R-100 para llevar a cabo el proceso. Esta metodología consiste en establecer las condiciones óptimas del equipo para proceder con las muestras. Se estableció el recirculador en 5°C aproximadamente, el baño a 40°C y la presión de la bomba se trabajó a aproximadamente 110 a 120 mbar. Posteriormente se asegura el matraz bola que es el encargado de recolectar el solvente eliminado en este caso el etanol, en el matraz principal se coloca la muestra y se conecta al equipo, una vez asegurada la muestra se coloca en el baño a 3 rpm en estado de rotación, hasta la eliminación del solvente. El tiempo de la eliminación del solvente varió dependiendo de su concentración. Este procedimiento se realizó individualmente para cada una de las muestras.

2.3.4. Liofilización de los extractos

Una vez eliminado el solvente hidroalcohólico las muestras de los extractos fueron congeladas a -20°C para posteriormente realizar el proceso de liofilización donde se trabajó en promedio con temperaturas de -45°C .

2.3.5. Medición de compuestos fenólicos totales por Folin-Ciocalteu

Para la medición de los compuestos fenólicos totales se utilizó el reactivo de Folin-Ciocalteu, con la siguiente metodología. En tubos de ensayo se colocaron $50\ \mu\text{L}$ de muestra en $950\ \mu\text{L}$ de agua, para un total de $1\ \text{mL}$ de muestra, posteriormente se añadió $250\ \mu\text{L}$ del reactivo de Folin-Ciocalteu, se homogenizó utilizando un vortex y posteriormente se dejó reaccionar por un periodo de 5 minutos, posteriormente se añadieron $750\ \mu\text{L}$ de Na_2CO_3 , después se mantuvieron en obscuridad por 90 minutos y se pasó a realizar la lectura en un espectrofotómetro a $760\ \text{nm}$. El blanco utilizado fue agua destilada y la concentración de la muestra se realizó comparando su valor contra el de una curva de calibración de ácido gálico de 5 a $50\ \text{mg/L}$.

2.3.6. Determinación de la capacidad antioxidante (DPPH)

Para determinar la habilidad de los extractos de poder eliminar los radicales libres se empleará el uso del radical libre DPPH siguiendo la metodología propuesta por Pawar y Desgupta, 2018 [55]. Se mezclaron $20\ \mu\text{L}$ de las muestras a diferentes concentraciones ($2\ \text{mg/mL}$ a $0.05\ \text{mg/mL}$) en $180\ \mu\text{L}$ del reactivo de DPPH $0.1\ \text{mM}$ preparado en metanol al 80% en una placa de ELISA de 96 pocillos. Metanol al 80% se utilizó como blanco. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente por 30 minutos, en oscuridad. La absorbancia será en un lector de placas a $517\ \text{nm}$. El porcentaje de captación de los radicales libres DPPH se calcularon mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de captación} = \frac{Abs_{control} - Abs_{muestra}}{Abs_{control}} * 100$$

2.3.7. Cromatografía de capa fina (TLC)

Para la identificación de los compuestos polifenólicos de los extractos se empleó la siguiente metodología de TLC, en la cual se contaron con los estándares de los ácidos fenólicos como ácido cafeico y ácido clorogénico y del flavonoide rutina. Las placas que se utilizaron fueron TLC Silica gel 60G F₂₅₄ 20 x 20 cm como fase estacionaria y para la fase móvil se utilizó acetato de etilo, ácido fórmico y agua (80:8:12 v/v/v). Se colocaron 10 µL de las muestras a concentración de 2 mg/mL, así como los estándares en la línea de salida, las muestras y los estándares fueron separados de 1 a 1.5 cm de distancia entre ellos. Las placas se revelaron en luz UV a 365 nm.

El factor de retención se calculó por medio de la siguiente fórmula:

$$R_f: \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto (a)}}{\text{Distancia recorrida por el frente del solvente (b)}}$$

2.3.8. Evaluación de neurotoxicidad de los extractos antioxidantes en un modelo *in vitro*

Para este ensayo *in vitro* se utilizó un cultivo celular de células neuronales PC-12. El cultivo de la línea neuronal PC-12 se realizará en medio RPMI-1640 suplementado con 20% de SFB. Posteriormente se colocaron en una estufa de incubación en condiciones de 37°C y 5% de CO₂ por 48 horas o hasta formada la monocapa. Ya que la confluencia celular se encuentra en un rango de 80% a 90%, se realizó el desprendimiento de la monocapa con el empleo de tripsina/EDTA y la posterior preparación en placas de 96 pocillos a concentración celular de 10,000 células/0.1 mL. las cuales se colocaron en cada uno de los pocillos, seguida de incubación en condiciones de 37°C, 5% de CO₂ por 24 horas. Transcurridas las 24 horas de incubación y formada la monocapa de la línea celular PC-12, en las placas de 96 pocillos. Se realizó el recambio de medio RPMI-1640 y posteriormente se depositaron 0.1 mL de los

compuestos a evaluar en un rango de 1000 µg/mL, por dilución seriada hasta 125 µg/mL. Como control positivo de neurotoxicidad se depositó tritón al 1%. Como control negativo se usaron los pocillos con células y medio de cultivo. La placa se incubo por 24 horas. Se retiró el medio de la placa de 96 pocillos y se colocó 0.1 mL de una solución de MTT a 5 mg/mL. Posteriormente se incubo en condiciones de 37°C, 5% de CO₂ por 3 horas. Una vez transcurrido este tiempo se cambió el medio por 200 µL de alcohol isopropílico con HCl y se incubo a obscuridad a temperatura ambiente. Finalizado el periodo de incubación se realizó la lectura de absorbancia a longitud de onda de 550 nm.

2.3.9. Evaluación de la capacidad antiinflamatoria de los extractos antioxidantes en un modelo *in vitro*

Para evaluar la capacidad antiinflamatoria de los extractos se utilizó la metodología de Saleem y colaboradores [54]. Se preparó un stock de BSA de 0.45 mL al 1% p/v, con agua destilada y se aforó con 0.05 mL, las soluciones control fueron preparadas remplazando el mismo volumen de agua con las soluciones de los extractos a concentraciones de 50-1600 µg/mL y el control correspondió a agua destilada. Todas las soluciones se incubaron a 37°C por 20 minutos y después a 60°C por 3 minutos, en un horno. Las soluciones fueron enfriadas a 37°C y se le añadieron 2.5 mL de PBS (pH 6.3). La absorbancia de las soluciones se determinó a 660 nm. Para obtener el porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente fórmula:

$$PI = \frac{Abs_{control+BSA} - Abs_{muestra}}{Abs_{control+BSA}} * 100$$

2.3.9. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos correspondientes fueron ANOVA, diseño factorial general, gráficos de efectos principales, a través de los programas de GraphPad Prism 8, SigmaPlot y Desingned expert 7.1.5.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se discutirán de manera detallada los resultados del proyecto de investigación. Dicha información respaldada con imágenes, tablas y gráficos para una mayor comprensión.

3.1. Extracción de los antioxidantes

Para la extracción de los compuestos antioxidantes se realizó una metodología convencional a base de solventes no tóxicos como el agua y etanol a diferentes concentraciones de 40 y 80%, con un tiempo de 30 minutos en agitación a 200 rpm, una relación masa solvente de 1:10 y temperaturas de 25 y 35° C. Una vez realizada la extracción se procedió a realizar los análisis correspondientes para determinar la cantidad de compuestos fenólicos totales, su capacidad antioxidante, la identificación de los compuestos en los extractos y su aplicación biomédica.

Como breve introducción de esta sección, se menciona que existen diversas técnicas de extracción que son empleadas para la obtención de compuestos antioxidantes, estas técnicas se pueden realizar en residuos o partes de plantas principalmente, sin embargo, en este proyecto se optó por una metodología convencional con solventes no tóxicos para la obtención de compuestos antioxidantes de las cáscaras de naranja y papa, así como, de su mezcla, una extracción convencional es poco común debido a las actuales técnicas avanzadas

para la extracción que pueden dar resultados con una mayor concentración de compuestos, pero la selección de esta metodología se centró en el cuidado medio ambiental y para demostrar la presencia de compuestos antioxidantes por medio de la misma, esto con ayuda de diversos factores como la agitación, temperatura, solvente y la relación masa solvente. Por lo tanto, esta metodología se comparó con diversos estudios, para determinar la eficiencia de la misma, de esta manera en un estudio realizado por M'hiri y colaboradores en el 2015, se comparó una extracción convencional contra 4 tipos de extracciones (ultrasonido, microondas, fluidos super críticos y alta presión), empleando etanol como solvente a 70 y 80%, dentro de los resultados observaron que la extracción convencional no presento diferencias significativas contra la extracción por ultrasonido [56], esto podría deberse a que una extracción por ultrasonido puede inducir la formación de radicales libres en el medio líquido y de esta manera causar la degradación de los biocomponentes, de igual manera la extracción convencional no presento diferencias significativas contra la extracción de alta presión, ya que, si bien la presión ayuda a romper la membrana celular para la obtención de los antioxidantes, esta misma presión afecta a estos compuestos degradándolos, causando una oxidación de los antioxidantes, así como, un reordenamiento con otras moléculas, en nuestra extracción se cuidaron diversos factores como lo fue los solventes no tóxicos y el trabajar con temperaturas consideradas temperaturas ambiente para el estado de Nuevo León, con la finalidad de aprovechar dichos residuos que son principalmente desechados en los diversos establecimientos del estado, tanto jugueras como restaurantes y mercados. Dentro de los resultados obtenidos se ha podido determinar que en base a una extracción convencional con temperaturas debajo de los 40 °C se han obtenido compuestos fenólicos ya que el trabajar con temperaturas arriba de la mencionada podría causar afectaciones en los rendimientos de los compuestos fenólicos.

3.2. Folin-Ciocalteu

Dentro de los resultados que se obtuvieron para los extractos medidos por medio de la técnica de Folin-Ciocalteu se pudo determinar la presencia de los compuestos fenólicos totales en diferentes concentraciones dentro de los extractos, de esta manera se observaron por medio de resultados cuantitativos cuales extractos son los que poseen la mayor cantidad de compuestos fenólicos totales.

En la tabla 4 se pueden observar los resultados por duplicado de la técnica de FC para los extractos de naranja (*Citrus sinsensis*), papa (*Solanum tuberosum*) y su mezcla. Como previamente se mencionó los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios presentes en diversas partes de las plantas y en muchos estudios a lo largo de los últimos años se han centrado en buscar la mejor técnica para la extracción de estos compuestos [18]. En el presente estudio empleando una metodología convencional, enfocada hacia el cuidado medioambiental se obtuvieron resultados de la prueba de FC, con valores que van desde 12.66 ± 0.01 hasta los 102.29 ± 0.08 mg GAE/ g, en los diferentes extractos que poseen diferentes concentraciones de solventes y temperaturas. La mayor obtención de compuestos fenólicos totales se obtuvo de las muestras realizadas con los residuos de las cáscaras de naranja, siendo el solvente agua donde se registraron los valores más altos de CFT con valores de 70.11 ± 0.03 y 76.76 ± 0.06 mg GAE/g, estos resultados difieren con lo mencionado por Mejía y colaboradores [35] ya que mencionan que a mayor temperatura se presenta una mayor obtención de compuestos fenólicos de las cáscaras de naranja, de igual manera Zhang y colaboradores [31], reportan algo similar en cuanto a que a mayor temperatura se obtienen más compuestos fenólicos, sin embargo, para ellos esto se cumple con el solvente de etanol al 40%, estos resultados solo coinciden con una de nuestras muestras de naranja que fue extraída con etanol al 40% y 25°C, donde se presentó la mayor obtención

de CFT, sin embargo, se menciona que la concentración del solvente en el estudio de Mejía y colaboradores solo fue importante para la obtención de la hesperidina [35], el cual es un flavonoide ampliamente reportado para las cáscaras de naranja. En su mayoría los resultados reportados por estos estudios para los CFT se encuentran entre 3.9 ± 0.2 mg GAE/g extracto [35] y 15.1 ± 0.02 mg GAE/g extracto [57], estos resultados difieren con los encontrados en nuestro proyecto, ya que nuestros resultados presentan valores mucho más altos de CFT, una posible explicación para esto, podría ser que en estos estudios de Mejía y Zhang se aplicaron rangos de temperaturas altas de 90° y 60° respectivamente, aunque los lapsos temporales solo fueron de 10 y 30 minutos, si bien, la temperatura pudo beneficiar al rompimiento celular y permitir la liberación de los antioxidantes en etanol al 40%, el trabajar con temperaturas muy altas podría afectar a los CF y por lo tanto causar que estos se degraden o que sufran un reordenamiento con otras moléculas, en nuestro caso trabajar con las temperaturas de 25 y 35°C pudo beneficiar a que esta degradación no se presentará.

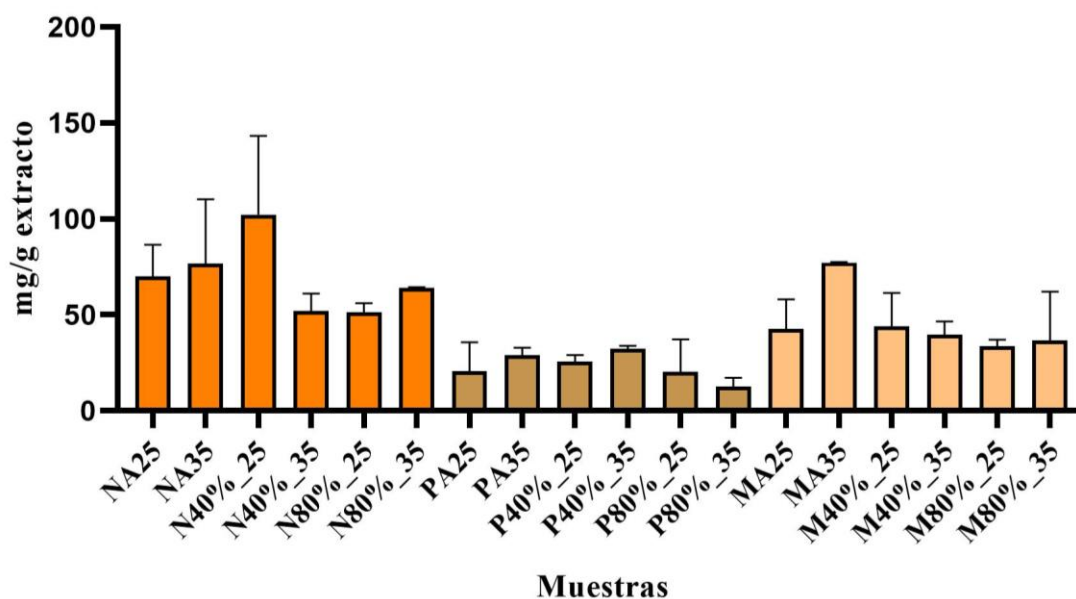
Los extractos con mayor obtención de compuestos fenólicos totales en nuestro estudio corresponden a los extractos de naranja, mientras que los extractos de papa fueron los que poseen menores concentraciones de CFT y para la mezcla se obtienen valores superando los 30 mg GAE/g extracto, en estos de extractos de la mezcla, solo la muestra tratada con agua y temperatura a 35°C (77.29 ± 0.00) es la que presenta valores similares a los extractos de naranja, como se puede observar dentro de los resultados presentados en la tabla 4 y el gráfico 1.

Tabla 4. Resultados cuantitativos de CFT.

Naranja (<i>Citrus sinensis</i>)		Papa (<i>Solanum tuberosum</i>)		Mezcla	
Muestras	mg GAE/g extracto	Muestras	mg GAE/g extracto	Muestras	mg GAE/g extracto
NA(25)	70.11 ± 0.03	PA(25)	20.64 ± 0.03	MA(25)	42.71 ± 0.03
NA(35)	76.76 ± 0.06	PA(35)	29.15 ± 0.01	MA(35)	77.29 ± 0.00
N40(25)	102.29 ± 0.08	P40(25)	25.69 ± 0.01	M40(25)	44.04 ± 0.03
N40(35)	52.02 ± 0.02	P40(35)	32.34 ± 0.00	M40(35)	39.52 ± 0.01
N80(25)	51.22 ± 0.01	P80(25)	20.37 ± 0.03	M80(25)	33.67 ± 0.01
N80(35)	63.99 ± 0.00	P80(35)	12.66 ± 0.01	M80(35)	36.60 ± 0.05

N: Naranja, P: Papa, M: Mezcla, A: agua, 40 y 80: solventes etanólicos en porcentaje, 25 y 35: temperaturas

Gráfico 1. Resultados de los CFT.



A continuación, se presenta en los siguientes gráficos de efectos principales dese se determinó la influencia de la biomasa, solvente y temperaturas con respecto a la obtención de los CFT para cada uno de los extractos.

En el gráfico 2 de efectos principales se observa la influencia de la biomasa con respecto a la obtención de los CFT. Dentro de estos resultados obtenidos se pudo determinar

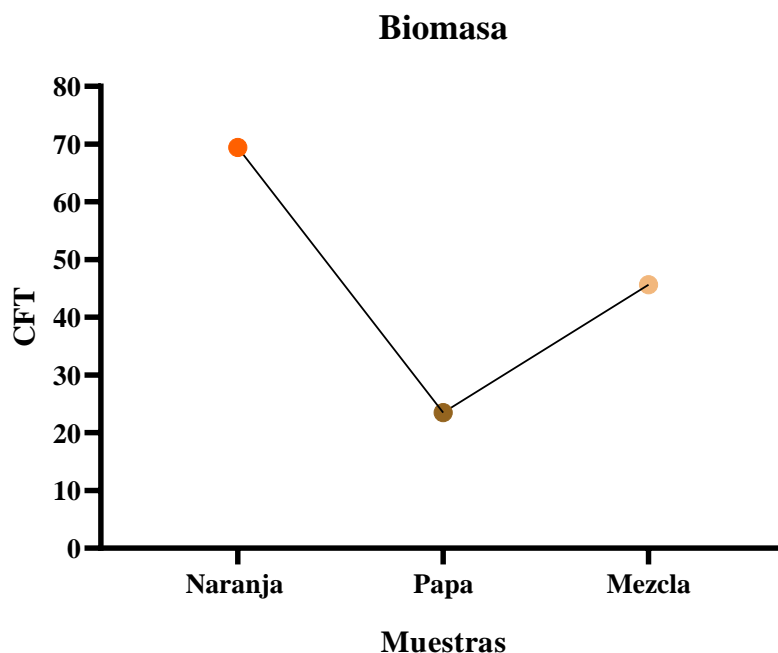
que el residuo de cáscaras de naranja presentaba una diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a los otros dos residuos, todo esto analizado por medio de un ANOVA para determinarlo. Los residuos de las cáscaras de naranja poseen abundantes polifenoles, tanto ácidos fenólicos, flavonoides, glucosidos de flavonona como la hesperidina, flavonas como la rutina, entre otros [57], la gran cantidad de CF presentes en las cáscaras de naranja da indicio de que este tipo de residuos puede ser importante para la obtención de los mismos, nuestros resultados coinciden con lo reportado por Farahmandfar y colaboradores [58] en donde obtuvieron valores de 65 mg GAE/g para las cáscaras de naranja, donde habían comparado el secado de las muestras de diversas maneras, siendo el secado por liofilización el que presentó los valores más altos, similar a nuestro proyecto donde los extractos de naranja presentaron valores superiores a los reportados por este estudio, de igual manera que dicho estudio nuestras muestras fueron llevadas a liofilización para la obtención de su peso seco. En nuestro proyecto la muestra no presentó un secado previo, la cual fue una mezcla homogénea congelada, para posteriormente realizar la extracción, lo cual puede ser benéfico ya que diversos factores de secados previos conllevan a degradación de los CF, principalmente secados con temperaturas altas (60 a 70°C), [58], [59].

Los residuos de la cáscara de papa presentaron los valores más bajos en este estudio, una posible explicación de esto puede deberse a diversos factores: las muestras al tratarse como residuos presentaban parte del tubérculo o papa y como previamente se mencionó el tubérculo no posee grandes cantidades de CF [41], afectando esto al momento del pesado ya que los restos de papa ejercían un peso y por defecto disminuían la extracción de los CF. Sin embargo, existe otros factores que podrían explicar la cantidad mínima de CF para la cáscara de papa, el congelar los residuos por un tiempo prolongado podría afectar a la cantidad de CF presentes, en nuestro proyecto esta etapa de congelación fue de aproximadamente 2

semanas hasta realizar la extracción, por lo que se podrían identificar más beneficios por esta etapa ya que se ha reportado que la congelación de las cáscaras de papa ayuda a retardar el efecto de la polifenol oxidasa [20]. El otro factor que podría haber afectado en nuestros extractos es justamente la enzima polifenol oxidasa la cual podría ser responsable de las concentraciones bajas de polifenoles en las cáscaras de papa, debido a que esta enzima muestra un máximo de actividad en un rango de temperaturas entre 20 a 60° y conforme incrementa la temperatura esta pierde su actividad [60]. Esto puede estar relacionado con lo reportado por Amado y colaboradores [61], donde a través de una extracción sólido líquido en relación 1:20 donde obtuvieron resultados entre 32 a 103 mg GAE/g trabajando a temperaturas altas de 89°C por 34 minutos, a esta temperatura fue donde se obtuvieron sus resultados más altos de CF, en este caso la temperatura pudo tener una influencia directa para estos resultados debido a que pudo inhibir la polifenol oxidasa [60], [20], en nuestro estudio se lograron obtener resultados de 12.66 ± 0.01 a 32.34 ± 0.00 para este tipo de residuo, cabe destacar que en nuestro caso las temperaturas permanecieron entre 25 a 35 °C, los extractos al estar en estas temperaturas pudieron verse afectados por la enzima polifenol oxidasa, la cual puede causar la degradación de los CF.

Como se puede observar en el gráfico 2, los resultados para la mezcla de los residuos dan valores intermedios entre la naranja y papa, conforme a los resultados anteriormente descritos estos valores podrían tener un mayor porcentaje de CF extraídos de la cáscara de naranja que la de la papa, debido que la papa mostro valores bajos en la obtención de los CF.

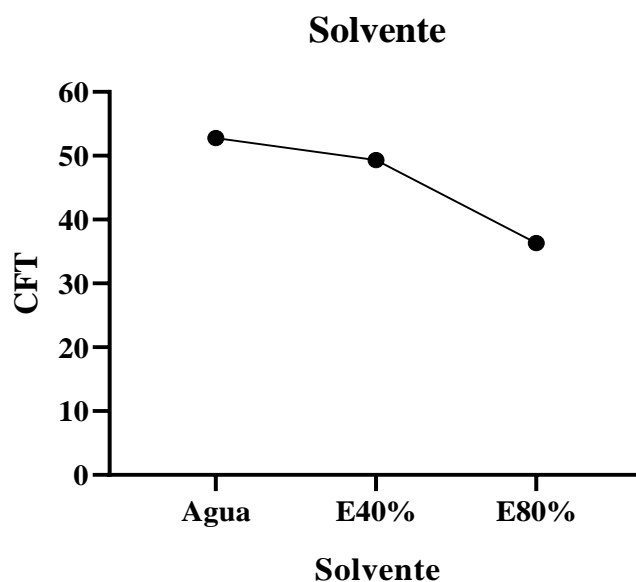
Gráfico 2. Efectos principales CFT en biomasa.



En el gráfico 3 de efectos principales se puede observar la influencia del solvente con respecto a la obtención de los CFT, no se mostraron diferencias significativas en estos resultados, solo se observa una tendencia de que el solvente de agua destilada fue el más eficiente para la obtención de los CFT. Amado y colaboradores [61], mencionan que para la obtención de los CF existe una relación entre la temperatura y la cantidad de solvente con una mayor concentración, ya que esta modificación de las propiedades físicas mejoran la difusividad del solvente y la solubilidad de los CF, algo que difiere con nuestros resultados ya que el solvente de agua presentó la mayor obtención de los CF, esto podría deberse a la solubilidad de los polifenoles y una mayor afinidad hacia este solvente. Venturi y colaboradores [62] reportan valores de CF de 2.92 ± 0.41 mg GAE/g para un extracto de cáscaras de papa obtenidos a través de agua y etanol al 10%, por medio de una extracción convencional sin aplicar temperatura, resultados similares a los encontrados en este estudio donde los solventes en este caso agua y etanol al 40% presentaron la mejor extracción

comparado con etanol al 80% (gráfico 3), por otro lado, Camapaza [63], menciona que los flavonoides presentan una mayor solubilidad en agua, todo esto debido a las estructuras base del esqueleto como lo son C6-C3-C6, que poseen por ejemplo la quercetina o la rutina, polifenoles que se encuentran ampliamente reportados para estos residuos orgánicos, mientras Safdar y colaboradores [64], mencionan que para los extractos de cítricos el mejor solvente corresponde a concentraciones de 80% de etanol, cumpliéndose lo mismo con el metanol a ese porcentaje, algo que difiere con respecto a nuestros resultados, donde pudimos observar que el agua tiende a liberar una mayor concentración de CF, en este estudio de Sadfar se atribuye a que el etanol mejora la solubilidad de los CF y el agua ayuda a la disrupción de los mismos hacia el solvente, razón por la cual reportan que el solvente de etanol al 80% es más eficiente, sin embargo, en nuestro proyecto atribuimos a que los polifenoles en un solvente concentrado no presenten una buena solubilidad debido a que algunos polifenoles tengan un fuerte enlace de hidrógeno con las proteínas, por lo que al añadirse el agua estos enlaces son debilitados y por lo tanto se obtiene una mayor solubilidad, determinando de esta manera que en nuestro proyecto el agua cumpliera con ambas características, por la afinidad de los polifenoles al agua se presentara una buena solubilidad y esta misma presentara una disrupción de los mismos, lo que hizo que estos se extrajeran de manera eficiente [65], [5].

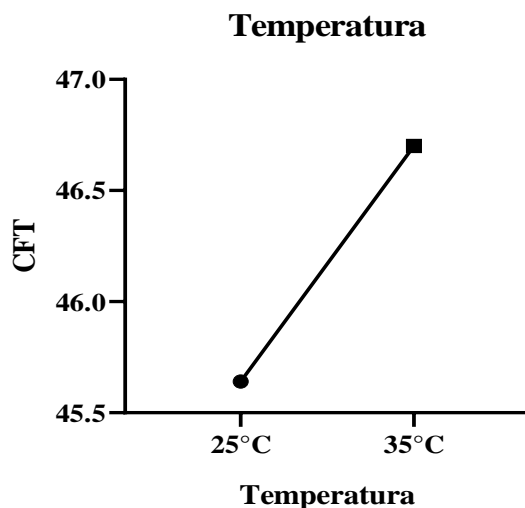
Gráfico 3. Efectos principales CFT solvente.



En el siguiente gráfico 4 de efectos principales, se puede observar la influencia de la temperatura con respecto a la liberación de los CF, con base a estos resultados no se encuentra una diferencia significativa con respecto a las temperaturas empleadas, sin embargo, se observa una tendencia a que la temperatura de 35°C, influyera en la liberación de los CF en los diversos extractos que fueron analizados. Una posible explicación para lo observado puede deberse a que la temperatura ayuda a la extracción debido a que permite una mejor solubilidad de los CF con el solvente. Sin embargo, el trabajar con temperaturas altas podría afectar la extracción de los CF debido a su alta sensibilidad al calor, por lo que se podría dar una descomposición o degradación de los CF [66]. Alean y colaboradores [67], mencionan que con un incremento alto de la temperatura, también se da una disminución de los CF, atribuyéndose esto al proceso oxidativo en presencia de estas temperaturas [68]. En un estudio realizado por Rafiq y colaboradores [7] se observó una disminución de CF al tratarse con temperaturas entre los 55 y 85°C causada por la oxidación y degradación térmica, en nuestro proyecto trabajar a temperaturas menores a las reportadas puede ser benéfico para la

obtención de los CF, sin embargo, existen CF que presentan una termoestabilidad alta como el ácido clorogénico, donde se ha comprobado que a 90°C permanece estable [69].

Gráfico 4. Efectos principales CFT temperatura.

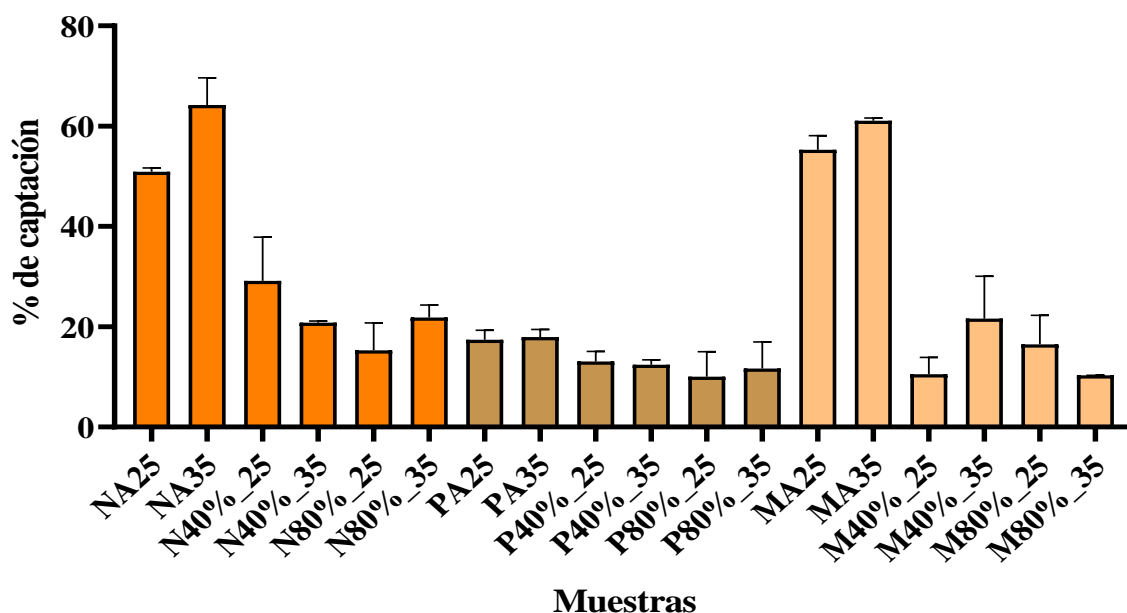


3.3. Actividad antioxidante (DPPH)

Dentro de los resultados que se obtuvieron para los extractos medidos por medio de la técnica del radical DPPH, se lograron determinar los extractos que poseen una mayor actividad antioxidante.

A continuación, en el gráfico 5 se presenta el porcentaje de captación de los extractos contra el reactivo DPPH. Como se puede observar solo 4 muestras poseen un porcentaje de captación superior al 50%, correspondiendo a los extractos de naranja con agua y sus temperaturas de 25 y 35°C, así como, los extractos de la mezcla con agua y sus temperaturas de 25 y 35°C, mientras que los extractos de papa mostraron porcentajes de captación muy bajos entre el 4 al 20%. El porcentaje de captación se realiza por el mecanismo antioxidante de los compuestos fenólicos, donde el radical DPPH presenta una coloración morada y al interactuar con los CF quienes donan un electrón al radical, haciendo que el reactivo se torne en un color amarillo [58].

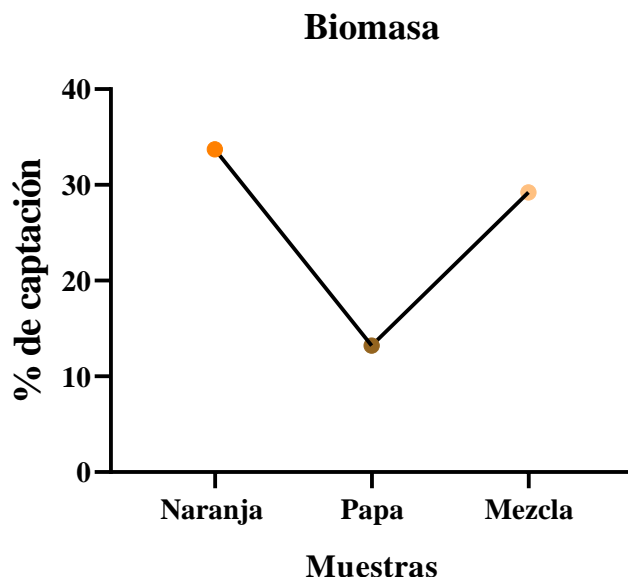
Gráfico 5. Porcentaje de captación de los extractos antioxidantes contra el radical DPPH.



En el siguiente gráfico 6 se observa la influencia de la biomasa con respecto al porcentaje de captación del radical DPPH. Dentro de los resultados observados se puede determinar que no existió una diferencia significativa, en cuando a la biomasa empleada, dichos valores están directamente relacionados con la cantidad de CF, por ejemplo, con lo observado en los residuos de papa, donde se muestran los valores más bajos de captación, algo estrechamente relacionado con la cantidad de CF, ya que en estos residuos se presentó la menor cantidad de los mismos, como se pudo observar en los gráficos anteriores (gráfico 1 y 2). A diferencia de los CFT la biomasa no presento diferencias significativas siendo valores cercanos entre las tres biomásas y también en el porcentaje de captación, sin embargo, los extractos de la cáscara de naranja presentan los valores más altos en cuanto a los porcentajes de captación, esto relacionado con la cantidad de CF, tal como lo menciona Farahmandfar y colaboradores [58], en donde la captación de radicales libres aumenta de manera proporcional al aumento de los CF, lo cual coincide con nuestros resultados ya que

los extractos de residuos de cáscaras de naranja presentaron los valores más altos de CFT, esto de igual manera siendo proporcional para los resultados del porcentaje de captación de las cáscaras de papa y la mezcla con respecto a los valores de CFT que se presentaron.

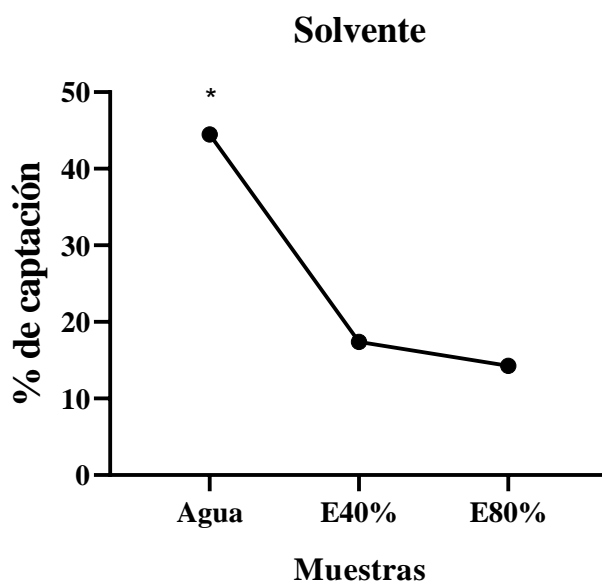
Gráfico 6. Efectos principales, porcentaje de captación, biomasa.



A continuación, en el gráfico 7 de efectos principales se observa la influencia del solvente con respecto al porcentaje de captación del radical DPPH. En los resultados presentados se pudo determinar una diferencia significativa ($p < 0.05$) en cuanto al solvente con agua destilada, siendo los extractos de agua donde se registraron valores de captación más altos, principalmente aplicando para los extractos de naranja y la mezcla. En un estudio realizado por Kim y colaboradores [70], realizaron una comparación del porcentaje de inhibición de los extractos empleando diversos solventes en cáscara de papa, dando como resultados que a 2.5 mg/mL se lograba un porcentaje de captación del 78% aproximadamente, mientras que a una concentración de 5 mg/mL se logró una captación del 97.9% todo esto utilizando un solvente de acetona, en nuestro proyecto solo para las muestras extraídas por medio de agua para las cáscaras de naranja y mezcla se logró una inhibición del 50% al 68%

con concentraciones entre 1 a 2 mg/mL para el IC50 (gráfico 9 y tabla 5), valores muy similares a lo reportado por Mejía y colaboradores [35], donde reportan un IC50 para sus extractos en 1.4 mg/mL, donde incluso en nuestro estudio se presenta una mayor actividad antioxidante (valores más bajos de IC50) correspondiendo para el extracto de naranja a 35°C (1.30 ± 0.14), todo esto obtenido a partir del solvente de agua, mientras que el extracto reportado por Mejía era con un solvente de etanol al 40%, con base a nuestros resultados se pudo comprobar que el extracto de agua proporciona valores similares en cuanto a su actividad antioxidante, los cuales son comparables con extractos de etanol o acetona.

Gráfico 7. Efectos principales. Porcentaje de captación, solvente.



En el gráfico 8 de efectos principales se observa la influencia de la temperatura con respecto al porcentaje de inhibición. Como se puede observar en estos resultados, los extractos que se trabajaron a la temperatura de 35°C muestran una tendencia hacia una mayor capacidad antioxidante, algo similar a lo observado en la obtención de CFT (gráfico 4), ya que esta temperatura permite una mayor liberación de los mismos, sin embargo, dentro de estos resultados obtenidos en cuanto a la influencia de la temperatura con la actividad

antioxidante, no se muestran diferencias significativas entre ambas temperaturas. En un estudio realizado por Jridi y colaboradores [71], se compararon dos extractos a través de una extracción soxhlet, donde las muestras secadas fueron comparadas con las muestras frescas, donde se obtuvo como resultados que las muestras sometidas a un secado mostraron valores más altos tanto de CF y de actividad antioxidante, en sus valores de IC50 las concentraciones fueron de 0.7 y 1.05 mg/mL para los extractos de muestras secas y frescas respectivamente, algo muy similar a lo encontrado en nuestros resultados, que se pueden observar en el gráfico 9 y tabla 5 con valores de 1.30 ± 0.14 y 1.48 ± 0.08 mg/mL de IC50, demostrándose de esta manera que la temperatura de 35°C fue más eficiente para la inhibición del 50% del radical DPPH, donde la influencia de esta temperatura pudo aportar a la liberación de los CF y por ende también a mejorar la solubilidad de los mismos en el solvente, todo esto debido a que la temperatura permitió una mayor transferencia de la matriz de las cáscaras hacia el solvente [35].

Gráfico 8. Efectos principales, porcentaje de captación, temperatura.

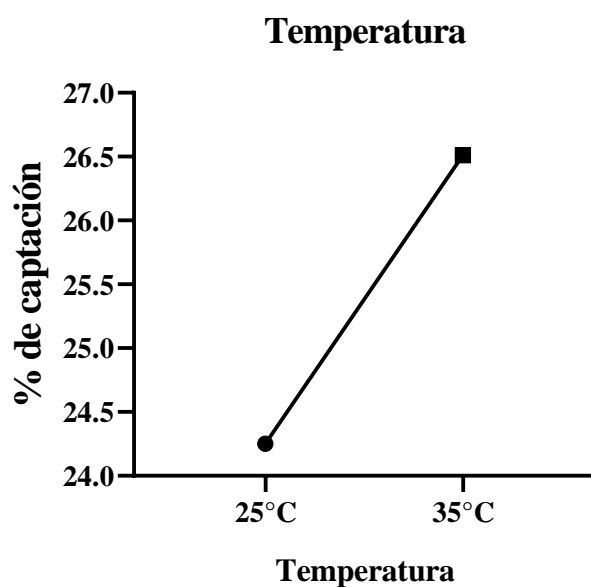


Gráfico 9. IC50.

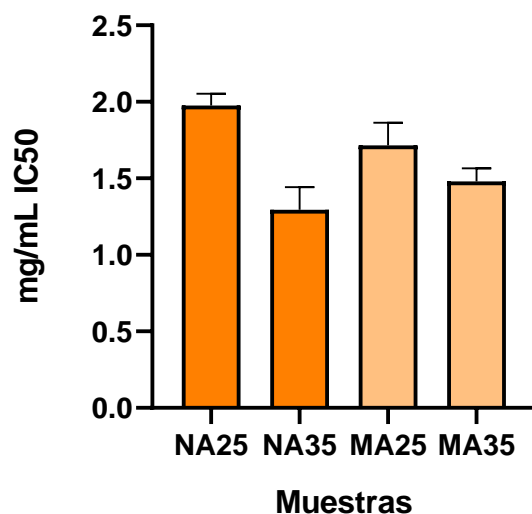
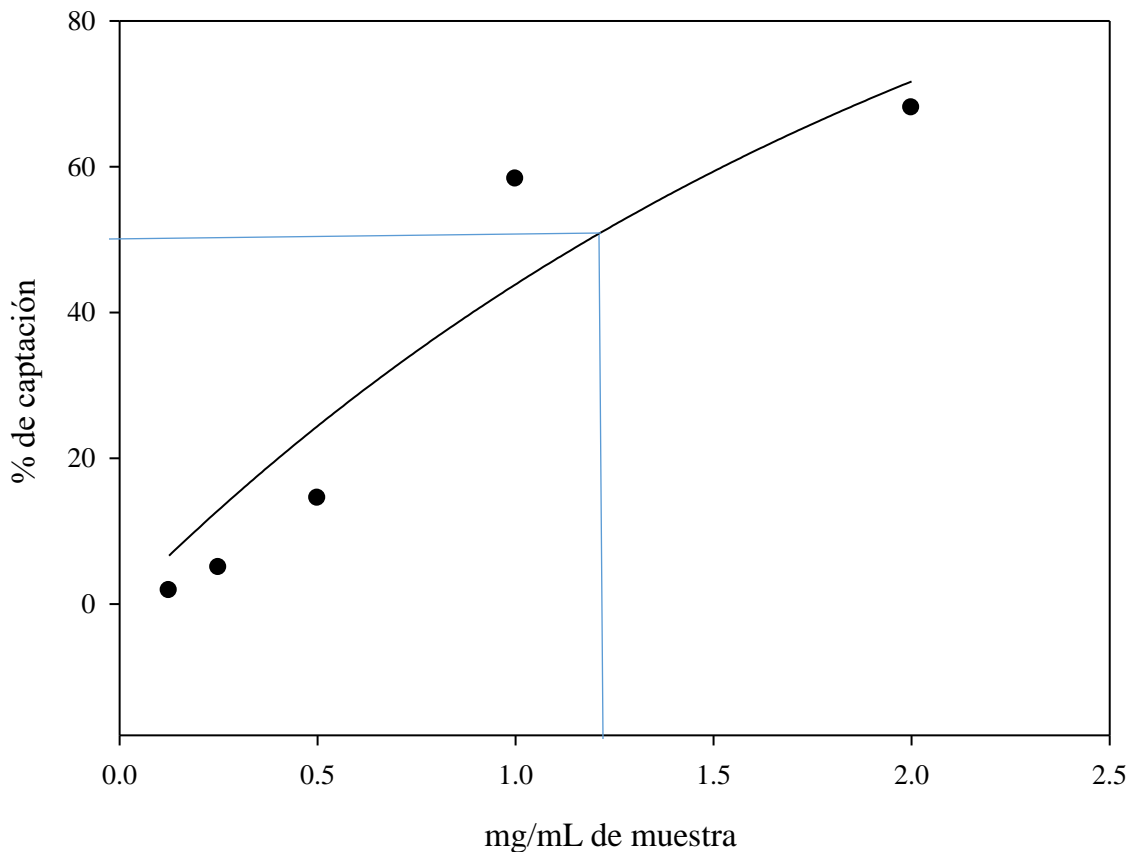


Tabla 5. IC50, inhibición en mg/mL.

DPPH IC50	
Muestra	mg/mL IC50
NA25	1.98 ± 0.07
NA35	1.30 ± 0.14
MA25	1.71 ± 0.14
MA35	1.48 ± 0.08

En el gráfico 10 se observa el IC50 para el extracto de naranja con agua a 35°C, donde presenta una inhibición del 50% en la concentración de 1.2 mg/mL, donde exhibe una inhibición cercana a algunos autores anteriormente descritos, donde el solvente y temperatura tuvieron un rol de mayor importancia para la obtención de estos resultados, los demás gráficos de IC50 se encontrarán en la sección de anexos.

Gráfico 10. IC50, extracto naranja en agua a 35°C.



3.4. Cromatografía de capa fina (TLC)

Para la identificación de los CF presentes en los extractos que presentaron mayores valores de CF, así como, de su capacidad antioxidante se realizó una TLC, donde los estándares utilizados fueron: rutina, quercetina, ácido gálico y ácido clorogénico, debido a que son los compuestos más reportados para las cáscaras de naranja y papa [35], [72].

En el gráfico 4 y 5 se puede observar los resultados de la TLC de los extractos, en el gráfico 4 se muestran los estándares en las primeras 4 hileras y en las hileras 5 a 9 se encuentran las muestras de los extractos y en la tabla 6 se muestran los valores de Rf de los estándares y de las muestras utilizadas.

La cromatografía de capa fina es una técnica cuya finalidad es separar los compuestos de una mezcla por su solubilidad y su interacción con la mezcla utilizada en la fase móvil. En un estudio realizado por Varut y colaboradores [73], en su parte experimental separaron 10 CF para la identificación de estos en extractos con propiedades antioxidantes, en nuestro proyecto utilizamos dos de los estándares empleados que fueron la rutina y el ácido clorogénico, donde en base al Rf reportado de 0.2 y 0.38 respectivamente, nosotros obtuvimos valores de 0.15 para la rutina y 0.37 para el ácido clorogénico, con base a esta señales pudimos identificar las señales obtenidas en nuestras muestras que se pueden observar en la figura 4 y descritas en la tabla 6. El ácido clorogénico constituye cerca del 90% de los fenoles encontrados en las cáscaras de papa [70],[20], algo que se puede observar dentro de este estudio, destacando su presencia en base a las señales en todas las muestras incluidas, tanto las muestras de naranja, mezcla y la muestra de papa donde se obtienen un Rf de 0.37, valor muy cercano al reportado por la literatura y a lo observado en base al estándar aplicado. La rutina es el otro compuesto que se pudo evidenciar a través de esta técnica, se identificó en todas las muestras excepto en la muestra de papa, donde esta señal no apareció (figura 4, tabla 6), mientras que en las muestras de los extractos de naranja y la mezcla esta señal se detecta con un Rf de entre 0.11 y 0.12, por lo que se puede interpretar que corresponda al compuesto de rutina, ya que este posee un Rf de 0.15. Las señales de esta técnica se pudieron observar a través de luz UV a 365 nm, donde los estándares correspondientes a la quercetina y ácido gálico se encontraban con valores de Rf altos de 0.94 y 0.89 respectivamente, donde ninguna de las muestras presento señales correspondientes a estos compuestos, como lo reporta Violante [24], con valores de 0.88 para quercetina y de 0.67 para ácido gálico, donde sus extractos mostraban señales tenues correspondientes a la presencia de quercetina. Los CF poseen un amplio rango de polaridad

por lo que la elección de la fase móvil es importante para poder determinarlos [35], en nuestro caso los estándares de quercetina y ácido gálico presentaban valores altos de R_f y determinar la presencia de estos en nuestros extractos no fue posible, ya que en dicha zona se encontraban bandas de algunos compuestos que no se separaron y por dicha razón, no se tuvo la certeza de que estos CF se pudieran encontrar en nuestro proyecto, además de que las señales presentes de algunos se mostraban tenues.

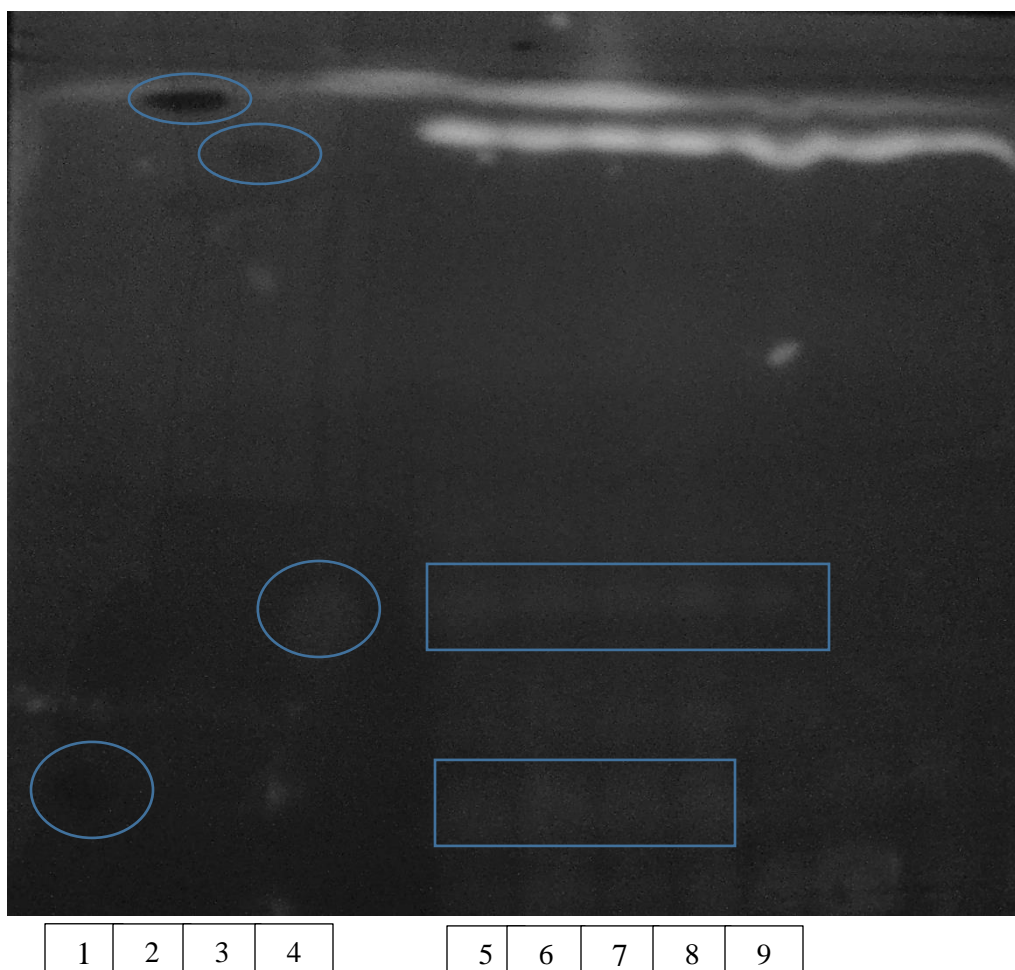


Figura 4. TLC, compuestos fenólicos.

Tabla 6. Factor de retención de muestras.

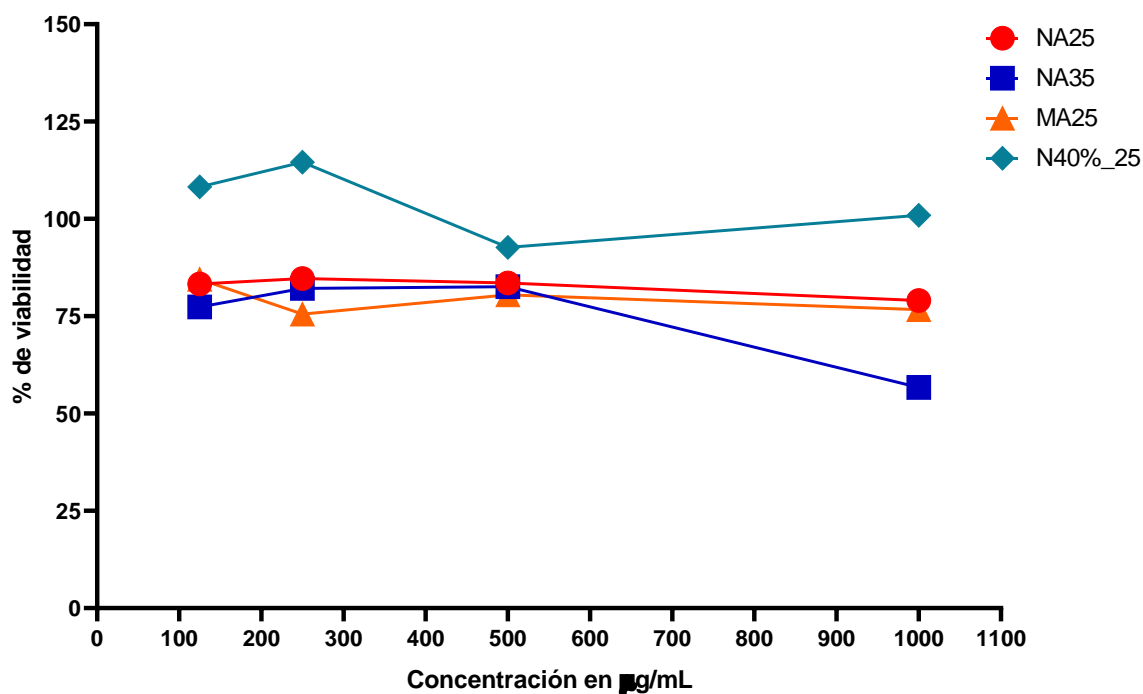
TLC			
Muestras		Factor de retención	
1	Rutina	0.15	
2	Quercetina	0.94	
3	Ácido gálico	0.89	
4	Ácido clorogénico	0.34	
5	NA25	0.37	
6	NA35	0.11	0.37
7	MA25	0.12	0.38
8	MA35	0.11	0.37
9	P35	0.37	

3.5. Medición de la neurotoxicidad de los extractos

En el gráfico 11 se presenta el porcentaje de viabilidad celular. La línea neuronal PC-12 fue sometida a diferentes concentraciones de los extractos antioxidantes (125 $\mu\text{g/mL}$ a 1000 $\mu\text{g/mL}$). Diversos estudios analizan los extractos naturales para determinar si estos pueden o no presentar una toxicidad, debido a que en este proyecto se busca una aplicación biomédica, se optó por determinar si estos presentan una toxicidad dentro de una línea neuronal PC-12. Ling si y colaboradores [52] reportan diversas concentraciones (6.25 $\mu\text{g/mL}$ a 100 $\mu\text{g/mL}$) de un extracto de Isocampneoside II (ICD), un glucósido extraído de del género *Pulownia*, el cual posee diversas propiedades biológicas, una de la cuales es su poder antioxidante, este ensayo se llevó a cabo en una línea celular PC-12. Dentro de los resultados se determinó que dicho extracto no posee un efecto neurotóxico y tampoco inhibitorio en el crecimiento celular, donde presentan valores de viabilidad celular entre un 95 al 100% en todas las concentraciones utilizadas. Dentro de los resultados obtenidos en nuestro proyecto se puede determinar que nuestros extractos antioxidantes tampoco poseen un efecto neurotóxico contra la línea neuronal PC-12, como se puede observar dentro del gráfico 11, donde los valores de la viabilidad celular permanecen entre 80 al 100%, con lo cual se puede

determinar que los extractos pueden ser aplicados para determinar su capacidad antioxidante dentro de modelos *in vivo* o modelos *in vitro*, esto podría determinarse en modelos con inducción de estrés oxidativo, para comprobar de esta manera tanto la viabilidad celular como el efecto protector de los antioxidantes ante un estrés oxidativo, como se menciona en el estudio realizado por Chan y colaboradores [74], donde demostró como los flavonoides obtenidos a partir del té verde, ejercen un efecto protector sobre la línea celular PC-12 ante el estrés oxidativo, aplicando en concentraciones de los flavonoides de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$ en contra de una concentración de 50 μM de H_2O_2 , donde se determinó que a las concentraciones de 80 a 100 $\mu\text{g/mL}$, se presentaba un efecto protector en la línea neuronal disminuyendo el estrés oxidativo de por encima del 50% y permitiendo una viabilidad celular, lo cual puede estar directamente asociado a los polifenoles antioxidantes, como la quercetina, kaempferol y los diversos glucósidos que se pueden encontrar. Este podría ser un modelo a aplicar en nuestros extractos para poder comprobar su aplicación biomédica, donde se comprueba que además de no ser extractos neurotóxicos, debido a que se conserva la viabilidad celular, también se comprueba como estos disminuyen o ejercen un efecto protector ante un agente causante de radicales libres o estrés oxidativo.

Gráfico 11. Porcentaje de viabilidad celular con concentraciones de los extractos.



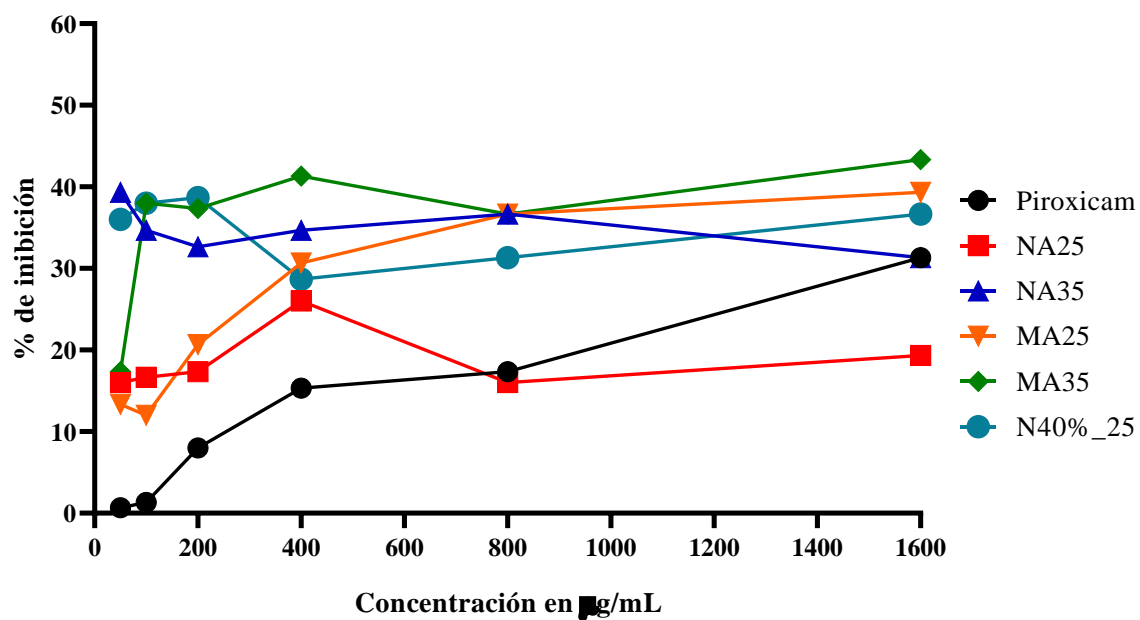
3.6. Evaluación de la capacidad antiinflamatoria de los extractos antioxidantes en un modelo *in vitro*

En el gráfico 12 se puede observar el porcentaje de inhibición de la desnaturalización del BSA. Los extractos y como estándar piroxicam, se colocaron en diversas concentraciones de 50 a 1600 µg/mL. En diversos estudios se han aplicado extractos antioxidantes para comprobar su aplicación biomédica, los compuestos fenólicos o polifenoles poseen diversas características, además de su actividad antioxidante, también pueden ejercer como compuestos antiinflamatorios. Como lo demuestra Saleem y colaboradores [54], donde mencionan como los extractos de moringa podrían ayudar en la inhibición de la desnaturalización del BSA en un estudio *in vitro* donde todos los extractos metanólicos presentaron un mayor porcentaje de inhibición ($83.41 \pm 0.35\%$) comparados con el fármaco piroxicam. Los compuestos químicos presentes fueron la quercetina, kaempferol el ácido gálico y otros polifenoles, los cuales se encontraban presentes en todos los extractos [75], atribuyéndoles su actividad antioxidante y antiinflamatoria, concluyendo que los extractos

podrían ser comparables e incluso mejores que los fármacos antiinflamatorios como el piroxicam. Chandra y colaboradores [76], también comprobaron esto a través de extractos del rizoma de la especie *Costus speciosus*, sin embargo, solo trabajaron en concentraciones de 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$, donde encontraron una inhibición de la desnaturalización del BSA del 45.15% y de 64.54%, respectivamente. En nuestro estudio se demuestran diversos porcentajes de inhibición dependiendo de los extractos y de las concentraciones del mismo, sin embargo, la mayoría de los extractos presentan valores de porcentaje de inhibición de la desnaturalización de BSA más altos que los del fármaco piroxicam, lo cual es similar a lo reportado por Salem y colaboradores [54], donde todos los extractos metanólicos presentaron dichos valores más altos, esto podría deberse a que la presencia del metanol permitió una buena afinidad de los compuestos fenólicos con este solvente, donde se ha mencionado previamente la presencia de la quercentina y ácido gálico, demostrados en la prueba de TLC (tabla 4 y figura 6), así como lo demuestra el estudio de Saleem, estos compuestos tienen una actividad antiinflamatoria lo que podría evitar la desnaturalización del BSA al someterse a temperaturas altas. Cabe destacar que el mayor porcentaje encontrado en los extractos correspondió al extracto de la mezcla con agua a 35 °C, con un porcentaje de un 43.33% a una concentración de 1600 $\mu\text{g/mL}$, el porcentaje de inhibición es similar al reportado por Chandra y colaboradores [76], sin embargo, en este estudio se presentó en 100 $\mu\text{g/mL}$, los extractos al ser de especies diferentes, así como la extracción y diversos factores ambientales, podrían influir, en nuestro estudio se recomienda trabajar con concentraciones más altas de los extractos, para determinar de esta manera si presentan una mayor protección del BSA ante la temperatura, sin embargo, dentro de los resultados obtenidos se pudo determinar una protección y en la mayoría de los extractos esta protección es incluso más alta que el fármaco

piroxicam, por lo que poseen una potencial aplicación biomédica ya sea en modelos *in vitro* o *in vivo*.

Gráfico 12. Porcentaje de inhibición de la desnaturalización de BSA.



CONCLUSIONES

Los extractos obtenidos con el solvente de agua destilada presentaron valores más altos, tanto para los compuestos fenólicos totales como para su actividad antioxidante.

La biomasa presenta diferencias significativas en la obtención de compuestos fenólicos, siendo los residuos de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*) los residuos que presentan mayor cantidad de compuestos fenólicos totales.

Para el porcentaje de captación en el método del DPPH, el solvente presentó diferencias significativas en cuanto al porcentaje de captación, en sinergia con la temperatura para los resultados del IC50.

Se logró identificar la presencia por medio de señales de los compuestos fenólicos correspondientes a al flavonoide rutina y el ácido fenólico que corresponde al ácido clorogénico.

Se comprobó una potencial aplicación biomédica de los extractos al determinar la protección del BSA, con los porcentajes más altos entre un 41 y 43% ante la desnaturalización de la proteína, por lo tanto, los extractos pueden aplicarse a diversos modelos *in vitro* o *in vivo*.

REFERENCIAS

- [1] SEMARNAT, “Fomento al aprovechamiento de la fracción orgánica de los RSU | Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales | Gobierno | gob.mx,” Jan. 10, 2017. <https://www.gob.mx/semarnat/acciones-y-programas/fomento-al-aprovechamiento-de-la-fraccion-organica-de-los-rsu> (accessed Mar. 28, 2020).
- [2] J. C. Peinemann and D. Pleissner, “Material Utilization of Organic Residues,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, no. August 2017, pp. 1–13, 2017, doi: 10.1007/s12010-017-2586-1.
- [3] N. Mirabella, V. Castellani, and S. Sala, “Current options for the valorization of food manufacturing waste: A review,” *J. Clean. Prod.*, vol. 65, pp. 28–41, 2014, doi: 10.1016/j.jclepro.2013.10.051.
- [4] A. Smeriglio *et al.*, “Antioxidant and cytoprotective activities of an ancient Mediterranean citrus (*Citrus lumia* Risso) albedo extract: Microscopic observations and polyphenol characterization,” *Food Chem.*, vol. 279, pp. 347–355, 2019, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.11.138.
- [5] K. Sharma, N. Mahato, M. H. Cho, and Y. R. Lee, “Converting citrus wastes into value-added products: Economic and environmentally friendly approaches,” *Nutrition*, vol. 34, pp. 29–46, 2017, doi: 10.1016/j.nut.2016.09.006.
- [6] D. Pleissner *et al.*, “Valorization of organic residues for the production of added value chemicals: A contribution to the bio-based economy,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 116, pp. 3–16, 2016, doi: 10.1016/j.bej.2015.12.016.
- [7] S. Rafiq, R. Kaul, S. A. Sofi, N. Bashir, F. Nazir, and G. Ahmad Nayik, “Citrus peel as a source of functional ingredient: A review,” *J. Saudi Soc. Agric. Sci.*, vol. 17, no. 4, pp. 351–358, 2018, doi: 10.1016/j.jssas.2016.07.006.
- [8] H. I. Abdel-Shafy *et al.*, “Solid waste issue: Sources, composition, disposal, recycling, and valorization,” *Water (Switzerland)*, vol. 11, no. 4, pp. 1275–1290, 2018, doi: 10.1016/j.ejpe.2018.07.003.
- [9] K. Vinck, L. Scheelen, and E. Du Bois, “Design opportunities for organic waste recycling in urban restaurants,” *Waste Manag. Res.*, vol. 37, no. 1_suppl, pp. 40–50, 2019, doi: 10.1177/0734242X18817714.
- [10] S. Hogg, D. Jones, P., & Crosswell, “The Real Economic Benefit of Separate Biowaste Collections,” *Engl. Renew. Energy Assoc. (REA), Eunomia Res. Consult. Ltd.*, 2016.
- [11] A. D. Bees and I. D. Williams, “Explaining the differences in household food waste collection and treatment provisions between local authorities in England and Wales,” *Waste Manag.*, vol. 70, pp. 222–235, 2017, doi: 10.1016/j.wasman.2017.09.004.

- [12] S. L. Sampaio *et al.*, “Potato peels as sources of functional compounds for the food industry: A review,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 103, no. March, pp. 118–129, 2020, doi: 10.1016/j.tifs.2020.07.015.
- [13] B. Satari and K. Karimi, “Citrus processing wastes: Environmental impacts, recent advances, and future perspectives in total valorization,” *Resour. Conserv. Recycl.*, vol. 129, no. October 2017, pp. 153–167, 2018, doi: 10.1016/j.resconrec.2017.10.032.
- [14] H. H. Wijngaard, M. Ballay, and N. Brunton, “The optimisation of extraction of antioxidants from potato peel by pressurised liquids,” *Food Chem.*, vol. 133, no. 4, pp. 1123–1130, 2012, doi: 10.1016/j.foodchem.2011.01.136.
- [15] O. P. Villalobos Victor, Suárez Victor, Fernández Salvador, Monreal David, Ovalle Ignacio, *Panorama Agroalimentario 2020, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP)*, 2020th ed. 2020.
- [16] B. Salehi *et al.*, “Antioxidants: Positive or Negative Actors?,” *Biomolecules*, vol. 8, no. 4, pp. 1–11, 2018, doi: 10.3390/biom8040124.
- [17] F. Rodríguez-Serrano, N. Mut-Salud, P. J. Álvarez, A. Aránega, J. M. Garrido, and E. Carrasco, “Antioxidant Intake and Antitumor therapy: toward nutritional recommendations for optimal results,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2016, pp. 1–19, 2015.
- [18] Z. Huyut, Ş. Beydemir, and I. Gülçin, “Antioxidant and antiradical properties of selected flavonoids and phenolic compounds,” *Biochem. Res. Int.*, vol. 2017, 2017, doi: 10.1155/2017/7616791.
- [19] P. Lizaur Girón, “Antioxidantes,” *Zaguan.Unizar.Es*, p. 157, 2014, [Online]. Available: [http://zaguan.unizar.es/TAZ/EUCS/2014/14180/TAZ-TFG-2014-408.pdf%0Ahttp://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ADRIAN REPILADO ALVAREZ.pdf](http://zaguan.unizar.es/TAZ/EUCS/2014/14180/TAZ-TFG-2014-408.pdf%0Ahttp://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ADRIAN%20REPILADO%20ALVAREZ.pdf).
- [20] H. Akyol, Y. Riciputi, E. Capanoglu, M. F. Caboni, and V. Verardo, “Phenolic compounds in the potato and its byproducts: An overview,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 6, 2016, doi: 10.3390/ijms17060835.
- [21] G. Agati *et al.*, “Are flavonoids effective antioxidants in plants? Twenty years of our investigation,” *Antioxidants*, vol. 9, no. 11, pp. 1–17, 2020, doi: 10.3390/antiox9111098.
- [22] D. Giordano *et al.*, “Bioactive compound and antioxidant activity distribution in roller-milled and pearled fractions of conventional and pigmented wheat varieties,” *Food Chem.*, vol. 233, pp. 483–491, 2017, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.04.065.
- [23] S. Galili and R. Hovav, *Determination of Polyphenols, Flavonoids, and Antioxidant Capacity in Dry Seeds*. Elsevier, 2014.
- [24] F. Violante and M. Pilar, *EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y*

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES Y FLAVONOIDEOS DE HOJAS DE DIFERENTES GENOTIPOS DE UGNI MOLINAE TURCZ. Santiago de Chile, 2015.

- [25] Z. Zou, W. Xi, Y. Hu, C. Nie, and Z. Zhou, “Antioxidant activity of Citrus fruits,” *Food Chem.*, vol. 196, no. September, pp. 885–896, 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.09.072.
- [26] S. Cruz, N. Marroquín, M. Ramos, and S. Pinales, “Evaluación de la actividad antioxidante y detección de marcadores químicos en extractos de hojas y granos de siete variedades de café comercializadas en Guatemala,” *Univ. San Carlos Guatemala*, pp. 1–73, 2018.
- [27] F. Braham *et al.*, “Online HPLC-DPPH screening method for evaluation of radical scavenging phenols extracted from Moringa oleifera leaves,” *South African J. Bot.*, vol. 129, pp. 146–154, 2020, doi: 10.1016/j.sajb.2019.04.001.
- [28] S. Casas-Grajales, “Antioxidants in liver health,” *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.*, vol. 6, no. 3, p. 59, 2015, doi: 10.4292/wjgpt.v6.i3.59.
- [29] G. Petruk, R. Del Giudice, M. M. Rigano, and D. M. Monti, “Antioxidants from plants protect against skin photoaging,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2018, 2018, doi: 10.1155/2018/1454936.
- [30] D. Ramful, T. Bajorun, E. Bourdon, E. Tarnus, and O. I. Aruoma, “Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application,” *Toxicology*, vol. 278, no. 1, pp. 75–87, 2010, doi: 10.1016/j.tox.2010.01.012.
- [31] J. J. Zhang, Y. Li, S. J. Lin, and H. Bin Li, “Green extraction of natural antioxidants from the sterculia nobilis fruit waste and analysis of phenolic profile,” *Molecules*, vol. 23, no. 5, 2018, doi: 10.3390/molecules23051059.
- [32] A. T. H. Mossa, T. M. Heikal, M. Belaiba, E. G. Raelison, H. Ferhout, and J. Bouajila, “Antioxidant activity and hepatoprotective potential of Cedrelopsis grevei on cypermethrin induced oxidative stress and liver damage in male mice,” *BMC Complement. Altern. Med.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–10, 2015, doi: 10.1186/s12906-015-0740-2.
- [33] A. T. H. Mossa and G. A. M. Nawwar, “Free radical scavenging and antiacetylcholinesterase activities of Origanum majorana L. essential oil,” *Hum. Exp. Toxicol.*, vol. 30, no. 10, pp. 1501–1513, 2011, doi: 10.1177/09603271110391686.
- [34] M. Kondeva-Burdina, A. Shkondrov, R. Simeonova, V. Vitcheva, I. Krasteva, and I. Ionkova, “In vitro/in vivo antioxidant and hepatoprotective potential of defatted extract and flavonoids isolated from Astragalus spruneri Boiss. (Fabaceae),” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 111, pp. 631–640, 2018, doi: 10.1016/j.fct.2017.12.020.
- [35] E. Gómez-Mejía, N. Rosales-Conrado, M. E. León-González, and Y. Madrid, “Citrus

- peels waste as a source of value-added compounds: Extraction and quantification of bioactive polyphenols,” *Food Chem.*, vol. 295, no. November 2018, pp. 289–299, 2019, doi: 10.1016/j.foodchem.2019.05.136.
- [36] B. Nayak *et al.*, *Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from Citrus sinensis peels*, vol. 187. Elsevier Ltd, 2015.
- [37] D. Pleissner and B. A. Rumpold, “Utilization of organic residues using heterotrophic microalgae and insects,” *Waste Manag.*, vol. 72, pp. 227–239, 2018, doi: 10.1016/j.wasman.2017.11.020.
- [38] B. Singh, J. P. Singh, A. Kaur, and N. Singh, “Phenolic composition, antioxidant potential and health benefits of citrus peel,” *Food Res. Int.*, vol. 132, 2020, doi: 10.1016/j.foodres.2020.109114.
- [39] D. A. Zema, P. S. Calabro, A. Folino, V. Tamburino, G. Zappia, and S. M. Zimbone, “Wastewater management in citrus processing industries: An overview of advantages and limits,” *Water (Switzerland)*, vol. 11, no. 12, pp. 1–23, 2019, doi: 10.3390/w11122481.
- [40] I. Ben Taher, P. Fickers, S. Chniti, and M. Hassouna, “Optimization of enzymatic hydrolysis and fermentation conditions for improved bioethanol production from potato peel residues,” *Biotechnol. Prog.*, vol. 33, no. 2, pp. 397–406, 2017, doi: 10.1002/btpr.2427.
- [41] C. Fritsch *et al.*, “Processing, valorization and application of bio-waste derived compounds from potato, tomato, olive and cereals: A review,” *Sustain.*, vol. 9, no. 8, pp. 1–46, 2017, doi: 10.3390/su9081492.
- [42] K. Ben Jeddou, F. Chaari, S. Maktouf, O. Nouri-Ellouz, C. B. Helbert, and R. E. Ghorbel, “Structural, functional, and antioxidant properties of water-soluble polysaccharides from potatoes peels,” *Food Chem.*, vol. 205, pp. 97–105, 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.02.108.
- [43] F. and A. Organization, *Citrus Fruit fresh and processed*. 2016, p. 47.
- [44] E. Bozinou, I. Karageorgou, G. Batra, V. G. Dourtoglou, and S. I. Lalas, “Pulsed Electric Field Extraction and Antioxidant Activity Determination of Moringa oleifera Dry Leaves: A Comparative Study with Other Extraction Techniques,” *Beverages*, vol. 5, no. 1, p. 8, 2019, doi: 10.3390/beverages5010008.
- [45] and B. G. Kexin Hao, Wenzhong Hu, Mengyang Hou, Duo Cao, Yu Wang, Qingxin Guan, Xiufu Zhang, Aosheng Wang, Jiaoxue Yu, “Optimization of ultrasonic-assisted extraction of total phenolics from citrus aurantium L. Blossoms and evaluation of free radical scavenging, Anti-HMG-CoA Reductase Activities,” *Molecules*, vol. 24, no. 13, 2019, doi: 10.3390/molecules24132368.
- [46] S. N. aee. Syed, W. Rizvi, A. Kumar, A. A. hma. Khan, S. Moin, and A. Ahsan, “In

- vitro antioxidant and in vivo hepatoprotective activity of leave extract of *Raphanus sativus* in rats using CCL4 model,” *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.*, vol. 11, no. 3, pp. 102–106, 2014, doi: 10.4314/ajtcam.v11i3.15.
- [47] Y. Pan, X. Long, R. Yi, and X. Zhao, “Polyphenols in liubao tea can prevent CCl₄-induced hepatic damage in mice through its antioxidant capacities,” *Nutrients*, vol. 10, no. 9, pp. 1–17, 2018, doi: 10.3390/nu10091280.
- [48] K. Ganesan, M. Jayachandran, and B. Xu, “A critical review on hepatoprotective effects of bioactive food components,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 58, no. 7, pp. 1165–1229, 2018, doi: 10.1080/10408398.2016.1244154.
- [49] S. K. Bhavsar, P. Joshi, M. B. Shah, and D. D. Santani, “Investigation into hepatoprotective activity of *Citrus limon*,” *Pharm. Biol.*, vol. 45, no. 4, pp. 303–311, 2007, doi: 10.1080/13880200701214995.
- [50] D. J. Kumar and R. J. Santhi, “Antioxidant and cytotoxic effects of hexane extract of *Morinda pubescens* leaves in human liver cancer cell line,” *Asian Pac. J. Trop. Med.*, vol. 5, no. 5, pp. 362–366, 2012, doi: 10.1016/S1995-7645(12)60060-1.
- [51] T. de Oliveira Fernandes, R. I. de Ávila, S. S. de Moura, G. de Almeida Ribeiro, M. M. V. Naves, and M. C. Valadares, “*Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) fruits protect HEPG2 cells against carbon tetrachloride-induced toxicity,” *Toxicol. Reports*, vol. 2, pp. 184–193, 2015, doi: 10.1016/j.toxrep.2014.11.018.
- [52] C. L. Si *et al.*, “Antioxidant properties and neuroprotective effects of isocampneoside II on hydrogen peroxide-induced oxidative injury in PC12 cells,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 59, pp. 145–152, 2013, doi: 10.1016/j.fct.2013.05.051.
- [53] C. Xiong, Q. Li, C. Chen, Z. Chen, and W. Huang, “Neuroprotective effect of crude polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Morchella importuna* against H₂O₂-induced PC12 cell cytotoxicity by reducing oxidative stress,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 83, pp. 569–576, 2016, doi: 10.1016/j.biopha.2016.07.016.
- [54] A. Saleem, M. Saleem, and M. F. Akhtar, “Antioxidant, anti-inflammatory and antiarthritic potential of *Moringa oleifera* Lam: An ethnomedicinal plant of Moringaceae family,” *South African J. Bot.*, vol. 128, pp. 246–256, 2020, doi: 10.1016/j.sajb.2019.11.023.
- [55] S. S. Pawar and D. Dasgupta, “Quantification of phenolic content from stem-bark and root of *Hugonia mystax* Linn. using RP-HPLC,” *J. King Saud Univ. - Sci.*, vol. 30, no. 3, pp. 293–300, 2018, doi: 10.1016/j.jksus.2016.09.002.
- [56] N. M’hiri, I. Ioannou, N. Mihoubi Boudhrioua, and M. Ghoul, “Effect of different operating conditions on the extraction of phenolic compounds in orange peel,” *Food Bioprod. Process.*, vol. 96, pp. 161–170, 2015, doi: 10.1016/j.fbp.2015.07.010.
- [57] J. J. Senit *et al.*, “Orange peel waste upstream integrated processing to terpenes, phenolics, pectin and monosaccharides: Optimization approaches,” *Ind. Crops Prod.*,

vol. 134, no. April, pp. 370–381, 2019, doi: 10.1016/j.indcrop.2019.03.060.

- [58] R. Farahmandfar, B. Tirgarian, B. Dehghan, and A. Nemati, “Changes in chemical composition and biological activity of essential oil from Thomson navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) peel under freezing, convective, vacuum, and microwave drying methods,” *Food Sci. Nutr.*, vol. 8, no. 1, pp. 124–138, 2020, doi: 10.1002/fsn3.1279.
- [59] E. I. Oikeh, F. E. Oviasogie, and E. S. Omoregie, “Quantitative phytochemical analysis and antimicrobial activities of fresh and dry ethanol extracts of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (sweet Orange) peels,” *Clin. Phytoscience*, vol. 6, no. 1, 2020, doi: 10.1186/s40816-020-00193-w.
- [60] S. S. Niphadkar, M. D. Vetal, and V. K. Rathod, “Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Waste Potato Peel by Aqueous Two-Phase Extraction,” *Prep. Biochem. Biotechnol.*, vol. 45, no. 7, pp. 632–649, 2015, doi: 10.1080/10826068.2014.940970.
- [61] I. R. Amado, D. Franco, M. Sánchez, C. Zapata, and J. A. Vázquez, “Optimisation of antioxidant extraction from *Solanum tuberosum* potato peel waste by surface response methodology,” *Food Chem.*, vol. 165, pp. 290–299, 2014, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.05.103.
- [62] F. Venturi *et al.*, “Potato peels as a source of novel green extracts suitable as antioxidant additives for fresh-cut fruits,” *Appl. Sci.*, vol. 9, no. 12, pp. 1–14, 2019, doi: 10.3390/app9122431.
- [63] P. Ipa and S. Di, “DETERMINACIÓN DE ÁCIDO CAFÉICO, EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO POLIFENÓLICO EN BRÁCTEAS SECAS DE *Cynara scolymus* L. (ALCACHOFA), AREQUIPA,” 2017.
- [64] M. N. Safdar, T. Kausar, S. Jabbar, A. Mumtaz, K. Ahad, and A. A. Saddozai, “Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques,” *J. Food Drug Anal.*, vol. 25, no. 3, pp. 488–500, 2017, doi: 10.1016/j.jfda.2016.07.010.
- [65] Z. Wissam, B. Ghada, A. Wassim, and K. Warid, “Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from Pomegranate’s peel,” *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 4, no. SUPPL.3, pp. 675–682, 2012.
- [66] N. M’hiri, I. Ioannou, M. Ghoul, and N. M. Boudhrioua, “Extraction Methods of Citrus Peel Phenolic Compounds,” *Food Rev. Int.*, vol. 30, no. 4, pp. 265–290, 2014, doi: 10.1080/87559129.2014.924139.
- [67] J. Alean, F. Chejne, and B. Rojano, “Degradation of polyphenols during the cocoa drying process,” *J. Food Eng.*, vol. 189, pp. 99–105, 2016, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2016.05.026.
- [68] K. Papoutsis *et al.*, “Pretreatment of citrus by-products affects polyphenol recovery: a

- review,” *Food Rev. Int.*, vol. 34, no. 8, pp. 770–795, 2018, doi: 10.1080/87559129.2018.1438471.
- [69] C. Lorentz *et al.*, “Coupling lipophilization and amylose complexation to encapsulate chlorogenic acid,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 90, no. 1, pp. 152–158, 2012, doi: 10.1016/j.carbpol.2012.05.008.
- [70] J. Kim, S. Y. Soh, H. Bae, and S. Y. Nam, “Antioxidant and phenolic contents in potatoes (*Solanum tuberosum* L.) and micropropagated potatoes,” *Appl. Biol. Chem.*, vol. 62, no. 1, 2019, doi: 10.1186/s13765-019-0422-8.
- [71] M. Jridi *et al.*, “Investigation of physicochemical and antioxidant properties of gelatin edible film mixed with blood orange (*Citrus sinensis*) peel extract,” *Food Packag. Shelf Life*, vol. 21, no. May, p. 100342, 2019, doi: 10.1016/j.fpsl.2019.100342.
- [72] M. Friedman, N. Kozukue, H. J. Kim, S. H. Choi, and M. Mizuno, “Glycoalkaloid, phenolic, and flavonoid content and antioxidative activities of conventional nonorganic and organic potato peel powders from commercial gold, red, and Russet potatoes,” *J. Food Compos. Anal.*, vol. 62, no. December 2016, pp. 69–75, 2017, doi: 10.1016/j.jfca.2017.04.019.
- [73] R. M. Varut, L. T. Rotaru, and M. C. Varut, “QSPR correlation of physico-chemical descriptors with the molecular surface area and Rf of ten polyphenolic compounds, separated from vegetal extracts by TLC,” *Rev. Chim.*, vol. 68, no. 8, pp. 1776–1779, 2017, doi: 10.37358/rc.17.8.5763.
- [74] C. S. Rha, H. W. Jeong, S. Park, S. Lee, Y. S. Jung, and D. O. Kim, “Antioxidative, anti-inflammatory, and anticancer effects of purified flavonol glycosides and aglycones in green tea,” *Antioxidants*, vol. 8, no. 8, 2019, doi: 10.3390/antiox8080278.
- [75] M. Denaro, A. Smeriglio, and D. Trombetta, “Antioxidant and anti-inflammatory activity of citrus flavanones mix and its stability after in vitro simulated digestion,” *Antioxidants*, vol. 10, no. 2, pp. 1–17, 2021, doi: 10.3390/antiox10020140.
- [76] K. Chandra, A. S. Salman, A. Mohd, R. Sweety, and K. N. Ali, “Protection against FCA induced oxidative stress induced DNA damage as a model of arthritis and In vitro anti-arthritic potential of *Costus speciosus* Rhizome extract,” *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.*, vol. 7, no. 2, pp. 383–389, 2015.

ANEXOS

Anexo 1. Tabla de ANOVA para las respuestas del diseño factorial general en la extracción de compuestos fenólicos en los extractos de cáscaras de naranja, papa y mezcla.

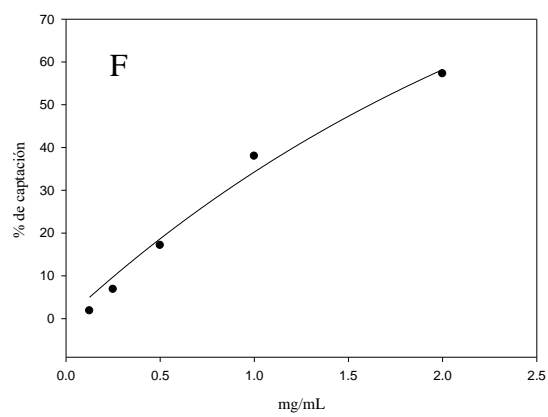
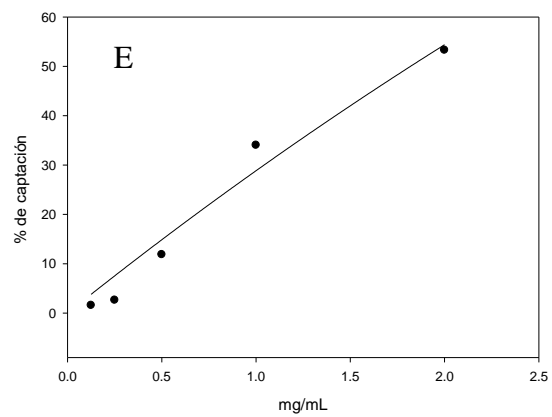
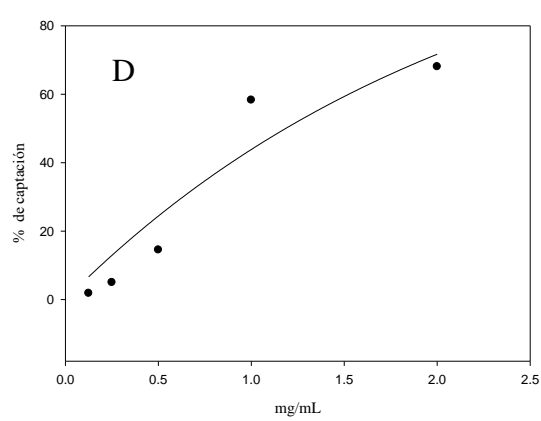
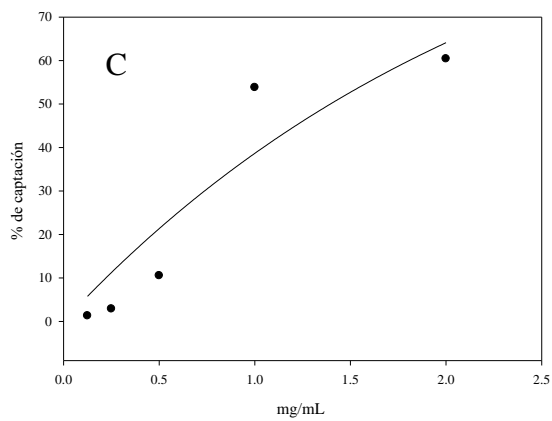
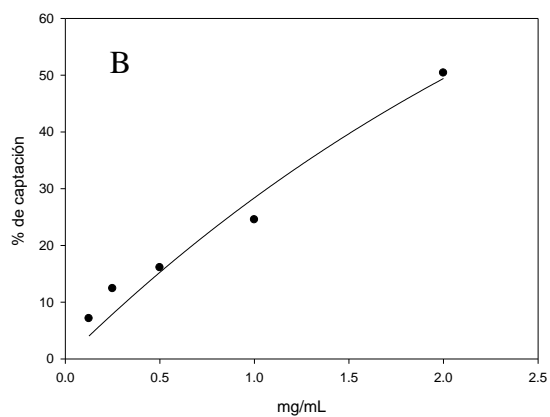
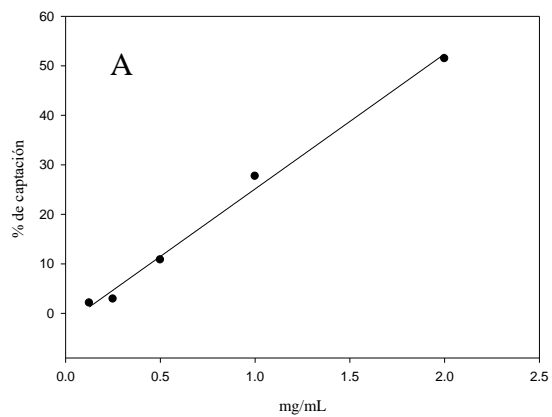
Tabla 7. ANOVA del diseño factorial general para la obtención de CFT, presentes en los extractos de residuos orgánicos.

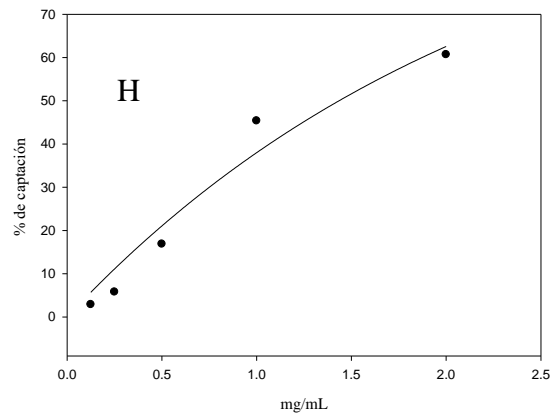
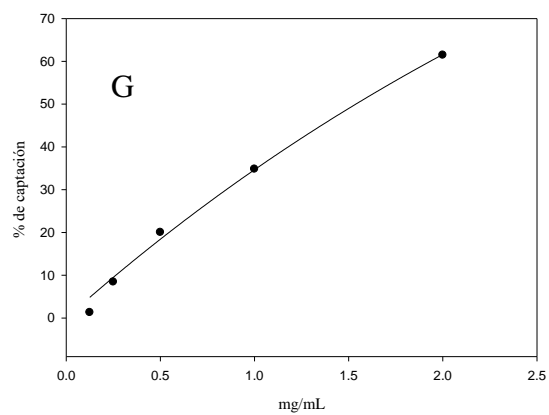
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	Valor p
Modelo	19305.36	17	1135.61	4.09	0.0024
A- Solvente	1783.73	2	891.86	3.21	0.0641
B- Biomasa	12658.36	2	6329.18	22.80	< 0.0001
C- Temperatura	10.17	1	10.17	0.037	0.8504
AB	728.83	4	182.21	0.66	0.6300
AC	1608.39	2	804.20	2.90	0.0811
BC	687.89	2	343.95	1.24	0.3132
ABC	1827.99	4	457.00	1.65	0.2061
Error	4995.96	18	277.55		
Total	24301.32	35			

Tabla 8. ANOVA del diseño factorial general para la actividad antioxidante DPPH de los extractos de residuos orgánicos.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	Valor p
Modelo	11966.34	17	703.90	35.14	< 0.0001
A- Solvente	6627.70	2	3313.85	165.44	< 0.0001
B- Biomasa	2790.68	2	1395.34	69.66	< 0.0001
C- Temperatura	46.04	1	46.04	2.30	0.1469
AB	2043.34	4	510.84	25.50	< 0.0001
AC	84.68	2	42.34	2.11	0.1498
BC	37.78	2	18.89	0.94	0.4079
ABC	336.12	4	84.03	4.20	0.0142
Error	360.55	18	20.03		
Total	12326.90	35			

Anexo 2. Gráficos de IC50 y porcentaje de captación de los extractos.





IC50, extractos A y B: Naranja agua 25°C; extractos C y D: Naranja agua 35°C; extractos E y F: Mezcla agua 25°C; extractos G y H; Mezcla agua 35°C.